



**HAL**  
open science

# Activation des cellules Natural Killer par les endocannabinoïdes Anandamide et 2-Arachidonoyl-glycérol

Thomas Bouachour

► **To cite this version:**

Thomas Bouachour. Activation des cellules Natural Killer par les endocannabinoïdes Anandamide et 2-Arachidonoyl-glycérol. Immunologie. Université d'Angers, 2012. Français. NNT : . tel-01003790

**HAL Id: tel-01003790**

**<https://theses.hal.science/tel-01003790>**

Submitted on 10 Jun 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Activation des cellules Natural Killer**  
**par les endocannabino ides**  
**Anandamide et 2-Arachidonoyl-glycérol**

**Thèse de doctorat**

Spécialité : Immunologie

**Ecole doctorale Biologie Santé** Nantes-Angers

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 septembre 2012 à Angers

Par : **Thomas BOUACHOUR**

Devant le jury:

Pr Olivier COQUERET (Président du jury).....	Professeur des Universités
Dr Sophie LAYE (Rapporteur).....	Directrice de Recherche
Dr Jean-Claude SIRARD (Rapporteur).....	Directeur de Recherche
Dr Yves DELNESTE (Directeur de thèse et examinateur).....	Directeur de Recherche

# SOMMAIRE

<b>Abréviations</b> .....	<b>6</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Les cellules Natural Killer</b> .....	<b>8</b>
1.1. <u>Les différents types de cellules NK : CD56<sup>bright</sup> / CD56<sup>dim</sup></u> .....	8
1.2. <u>Développement des cellules NK dans la moelle osseuse</u> .....	9
1.2.1. <u>Les 5 stades de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques</u> <u>CD34<sup>+</sup></u> .....	10
1.2.2. <u>Cas particuliers : Développement des cellules NK dans les ganglions</u> <u>lymphatiques, le foie et le thymus</u> .....	11
1.3. <u>Les récepteurs</u> .....	12
1.3.1. <u>La superfamille des immunoglobulines</u> .....	13
1.3.1.1. Les récepteurs KIR.....	13
1.3.1.2. Les récepteurs LIR.....	15
1.3.1.3. Les récepteurs LAIR.....	15
1.3.2. <u>La super famille des lectines de type C</u> .....	16
1.3.2.1. Ly49.....	16
1.3.2.2. CD94/NKG2.....	16
1.3.2.3. NKG2D.....	17
1.3.2.3.1. Les fonctions de NKG2D.....	17
1.3.2.3.2. Les ligands MICA et MICB.....	17
1.3.2.4. CD69.....	18
1.4. <u>Les principales fonctions des cellules NK</u> .....	18
1.4.1. <u>La cytotoxicité</u> .....	18
1.4.1.1. Les granules lytiques.....	20
1.4.1.1.1. Granzymes.....	20
1.4.1.1.2. Perforine.....	20
1.4.1.2. La famille du TNF.....	21
1.4.1.2.1. FasL.....	21
1.4.1.2.2. TRAIL.....	21

1.4.1.2.3.	Mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par FasL et TRAIL .....	22
1.4.1.3.	La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).....	24
1.4.2.	<u>L'activité immuno-régulatrice</u> .....	24
1.4.2.1.	Les récepteurs aux cytokines.....	25
1.4.2.2.	La production de cytokines.....	26
1.4.2.3.	Les récepteurs aux chimiokines.....	26
1.4.2.4.	Les chimiokines.....	27
1.4.2.5.	Le dialogue entre les cellules NK et les cellules dendritiques.....	27
1.4.3.	<u>Les cellules NK mémoires</u> .....	29
<b>2.</b>	<b>Le Système endocannabinoïde</b> .....	<b>30</b>
2.1.	<u>Généralités</u> .....	30
2.2.	<u>Les récepteurs endocannabinoïdes</u> .....	32
2.2.1.	<u>Les récepteurs CB1 et CB2</u> .....	32
2.2.1.1.	Structures et fonctions.....	32
2.2.1.2.	Localisation.....	33
2.2.1.3.	Signalisation.....	34
2.2.1.3.1.	Inhibition de la voie de l'AMP cyclique.....	34
2.2.1.3.2.	Activation de la voie de l'AMP cyclique.....	35
2.2.2.	<u>TRPV1</u> .....	35
2.2.3.	<u>GPR55</u> .....	36
2.3.	<u>Les principaux ligands endocannabinoïdes</u> .....	36
2.3.1.	<u>L'anandamide</u> .....	36
2.3.1.1.	Biosynthèse.....	36
2.3.1.2.	Dégradation.....	37
2.3.2.	<u>Le 2-arachydonoylglycérol</u> .....	39
2.3.2.1.	Biosynthèse.....	39
2.3.2.2.	Dégradation.....	39
<b>3.</b>	<b>Rôle du système endocannabinoïde dans le système nerveux central (SNC)</b> .....	<b>40</b>
3.1.	<u>La plasticité synaptique</u> .....	40

3.1.1. <u>Les endocannabinoïdes, médiateurs de la plasticité synaptique (dépression) à court terme</u> .....	41
3.1.2. <u>Les endocannabinoïdes, médiateurs de la plasticité synaptique (dépression) à long terme</u> .....	42
<b>4. Rôle du système endocannabinoïde dans le système immunitaire</b> .....	<b>42</b>
4.1. <u>Récepteurs endocannabinoïdes et système immunitaire</u> .....	42
4.2. <u>Modulation du système immunitaire par les endocannabinoïdes</u> .....	43
4.2.1. <u>Métabolisme des endocannabinoïdes par le système immunitaire</u> .....	43
4.2.2. <u>Propriétés immuno-suppressives des endocannabinoïdes</u> .....	44
4.2.3. <u>Effet pro-inflammatoire</u> .....	44
4.3. <u>Effets des endocannabinoïdes sur les différents types cellulaires du système immunitaire</u> .....	45
4.3.1. <u>Les lymphocytes et les cellules hématopoïétiques</u> .....	45
4.3.2. <u>Les macrophages</u> .....	46
4.3.3. <u>Les mastocytes</u> .....	46
4.3.4. <u>Les cellules dendritiques</u> .....	46
4.3.5. <u>Les cellules NK et les neutrophiles</u> .....	47
<b>5. Rôle du système endocannabinoïde dans le cancer</b> .....	<b>47</b>
5.1. <u>Rôle du système endocannabinoïde dans la biologie des tumeurs</u> .....	48
5.1.1. <u>Expression des endocannabinoïdes dans le cancer</u> .....	48
5.1.2. <u>Les récepteurs endocannabinoïdes dans le cancer</u> .....	49
5.1.3. <u>Les fonctions anti-tumorales du système endocannabinoïde</u> .....	50
5.1.3.1. Effet anti-prolifératif .....	50
5.1.3.2. Induction de l'apoptose.....	50
5.1.3.3. Inhibition de l'invasion tumorale.....	51
5.1.3.4. Inhibition de l'angiogénèse.....	51
5.1.4. <u>Les fonctions pro-tumorales des endocannabinoïdes</u> .....	52
5.1.4.1. Inhibition de l'immunité anti-tumorale.....	52
5.2. <u>Le système endocannabinoïde, une cible thérapeutique ?</u> .....	52

<b>Objectifs</b> .....	<b>56</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>57</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>91</b>
<b>1. Endocannabinoïdes et cellules NK</b> .....	<b>91</b>
a. Importance de la concentration en endocannabinoïdes sur l'activation des cellules NK.....	91
b. Effet des endocannabinoïdes sur la biologie des cellules NK.....	93
c. Les interactions des ligands AEA et 2-AG avec le récepteur CB2.....	95
<b>2. Endocannabinoïdes et immuno-régulation</b> .....	<b>96</b>
<b>3. Endocannabinoïdes et thérapie anti-tumorale</b> .....	<b>97</b>
<b>4. Perspectives</b> .....	<b>98</b>
<b>Références</b> .....	<b>99</b>

## ABREVIATIONS

2-AG :	2-arachidonoylglycerol
Ac :	Anticorps
ADCC :	Antibody-dependent cell cytotoxicity
AEA :	Anandamide
CB1 :	Cannabinoid receptor 1
CB2:	Cannabinoid receptor 2
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA :	Cellules présentatrice d'antigène
DC :	Cellule dendritique (Dendritic cell)
DES :	Depolarization-induced suppression of excitation
DISC :	Death-inducing signal complex
DSI :	Depolarization-induced suppression of inhibition
EGFR :	Epidermal growth factor receptor
FAAH :	Fatty acid amide hydrolase
FADD :	Fas-associated death domain
FasL :	Fas ligand
Fc :	Fragment constant
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
ITAM :	Immunoreceptor tyrosine-based activating motifs

ITIM :	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs
KIR :	Killer-immunoglobulin-like receptor
LAIR :	Leucocyte-associated inhibitory receptor
LIR :	Leucocyte inhibitory receptor
LPS :	Lipopolysaccharide
MAG :	Monoacylglycérol
NK :	Natural Killer
NKD :	Natural killer domain
OPG :	Ostéoprotégérine
PBMC :	Peripheral blood mononuclear cell
PKC :	Protéine kinase C
RCPG :	Récepteur couplé aux protéines G
SCF :	Stem cell factor ou KL
SNC :	Système nerveux central
TCR :	Récepteur des cellules T (T cell receptor)
$\Delta^9$ -THC :	$\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol
TNF $\alpha$ :	Tumor necrosis factor $\alpha$
TRAIL :	Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
VEGF :	Vascular endothelial growth facteur



# INTRODUCTION

Cette première section introduira les notions nécessaires à la compréhension de ce travail de thèse. La première partie portera sur un type cellulaire de l'immunité innée, les cellules Natural Killer (NK). Les différents points abordés seront : la genèse des cellules NK, les principaux récepteurs activateurs et inhibiteurs impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire, les deux grandes fonctions des cellules NK, à savoir, l'immuno-régulation et l'activité cytotoxique, puis nous parlerons de la régulation des cellules NK par des facteurs solubles, comme les cytokines, et les interactions avec les autres cellules de l'immunité, telles que les cellules dendritiques. La deuxième partie décrira le système endocannabinoïde, ces différents constituants, (récepteurs, ligands) et ses différents rôles dans des systèmes biologiques, tel que le système nerveux. Son rôle dans le système immunitaire, ainsi que ses implications dans la biologie des cancers seront plus particulièrement développés.

## 1. Les cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer (cellules NK) sont un des composants essentiels du système immunitaire et plus précisément de l'immunité innée. Ils représentent environ 15% des lymphocytes circulants. La définition phénotypique des cellules NK se traduit par l'expression du marqueur de surface CD56 (NCAM) et l'absence d'expression du CD3. Les deux propriétés principales des cellules NK sont (1) la production de médiateurs solubles immuno-régulateurs (cytokines et chimiokines) et (2) la lyse des cellules cibles infectées ou anormales (cellules tumorales) [1]. Les propriétés cytotoxiques des cellules NK ne sont pas restreintes aux complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) comme peuvent l'être les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

### 1.1. Les différents types de cellules NK : CD56<sup>bright</sup> / CD56<sup>dim</sup>

Les cellules NK peuvent être classées en deux catégories principales en fonction du profil d'expression du marqueur de surface CD56 : la population CD56<sup>bright</sup> et la population CD56<sup>dim</sup>. La majorité des cellules NK (90%) ont une faible densité d'expression du CD56 (CD56<sup>dim</sup>) et un fort taux d'expression du récepteur de type III du fragment Fcγ ou CD16 ; ces cellules NK sont donc CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup>. L'autre population, minoritaire (10%), est

représentée par les cellules CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup>. Ces deux sous populations présentent des capacités différentes de cytotoxicité, de production de cytokines ainsi que dans la nature de la réponse induite par une activation cytokinique [2-4].

Les cellules NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> ont surtout une activité immuno-régulatrice *via* la production de nombreuses cytokines : interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, IL-10, et IL-13 qui sont produites après stimulation. En revanche, la production de cytokines immuno-régulatrices par les cellules NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> peut être considérée comme négligeable, même après stimulation [2]. Des études fonctionnelles réalisées par Lanier et ses collègues [5] ont montré que les cellules CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> présentent une capacité cytotoxique beaucoup plus importante que les cellules CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup>.

## 1.2. Développement des cellules NK dans la moelle osseuse

Les cellules NK sont issues de progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ils sont considérés comme la troisième catégorie majeure de lymphocytes malgré leur classification comme cellules de l'immunité innée, les deux autres types de lymphocytes étant les lymphocytes T et les lymphocytes B. Contrairement aux lymphocytes T et B, les cellules NK ne possèdent pas de complexe moléculaire permettant une reconnaissance antigénique spécifique (TCR et anticorps) et ne réalisent pas de recombinaison génique sur les différents gènes codant pour les récepteurs activateurs et inhibiteurs présents à leur surface.

Les cellules NK, comme les lymphocytes B et les cellules myéloïdes, commencent leur développement dans la moelle osseuse. Mais, contrairement aux lymphocytes T, la maturation des cellules NK ne nécessite pas de passage dans le thymus. Ces différents types de lymphocytes sont issus des mêmes progéniteurs hématopoïétiques pluripotents, caractérisés par l'expression du marqueur CD34. Son expression est perdue au fur et à mesure de la différenciation vers les cellules NK qui perdent leur pluri potentialité. A ce jour, la principale molécule responsable de la différenciation des cellules pluripotentes en cellules NK est l'IL-15 [6]. Récemment, une revue réalisée par Freud AG et Caligiuri MA a décrit 5 stades arbitraires de développement pour aboutir à la cellule NK mature [7]. Ces différents stades se caractérisent par l'expression ou non de marqueurs de surface et par la fonction cellulaire associée.

### 1.2.1. Les 5 stades de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>

Le premier stade débute par l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> dans la voie des cellules NK. Durant cette phase précoce, des facteurs stromaux sont nécessaires. Les médiateurs SCF (stem cell factor ou KL, flt3 ligand ou FL), IL-3 et IL-7 permettent le passage d'un phénotype pro-cellules NK ou progéniteur hématopoïétique CD34<sup>+</sup> (CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>-</sup>/CD94<sup>-</sup>), qui n'est pas sensible à l'action de l'IL-15, à un phénotype pré-cellules NK correspondant au stade 2 et pouvant répondre à l'IL-15. Sous l'influence de ces facteurs stromaux, les pro-cellules NK CD34<sup>+</sup> voient l'expression des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur à l'IL-15 augmenter. Ces cellules deviennent alors sensibles à l'action de l'IL-15 ou de l'IL-21 (cytokine apparentée à l'IL-15).

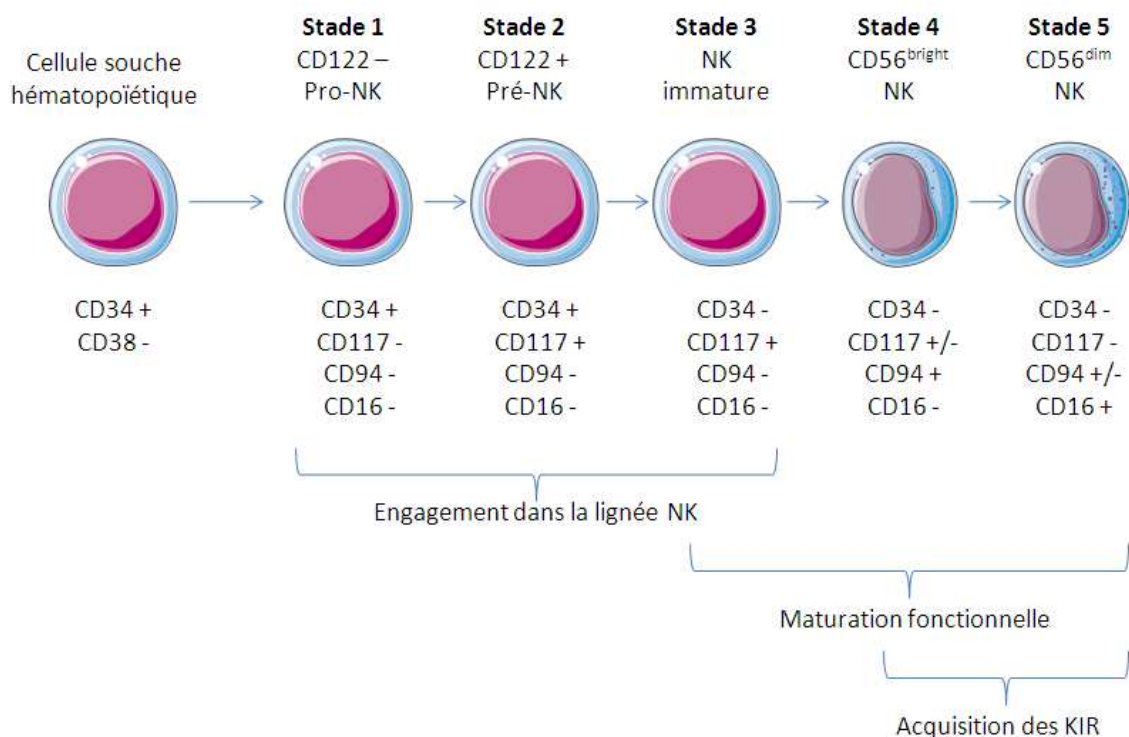
Le deuxième stade de développement correspond aux cellules qui, ayant acquis le marqueur CD122 (chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-2), répondent à l'action de l'IL-15 (ou de l'IL-2). A ce stade, les cellules ne possèdent pas de marqueurs spécifiques des cellules NK et peuvent encore emprunter les voies de différenciation des lymphocytes T. Leur phénotype est CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD94<sup>-</sup>.

Au stade 3, les cellules NK sont immatures (immature NK ou iNK). Les cellules iNK sont définitivement engagées dans la voie des cellules NK et ne peuvent plus se différencier en un autre type cellulaire. Les cellules iNK expriment alors quelques uns des marqueurs caractéristiques des cellules NK, tels que les molécules CD56 ou NKp44. Bien qu'à ce stade la cellule ressemble fortement à une cellule NK mature, elle n'en a pas les fonctionnalités. En effet, les cellules ne peuvent pas sécréter d'IFN $\gamma$  et sont incapable d'effectuer une action lytique dépendante de la perforine contre des cellules n'exprimant pas le CMH de type I (CMH-I). Leur phénotype à ce stade est CD34<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD94<sup>-</sup>.

Le passage du stade 3 au stade 4 est marqué par l'acquisition des marqueurs CD94 et NKG2A qui vont conférer à la cellule une tolérance vis-à-vis du CMH-I de l'hôte. D'autres marqueurs font également leur apparition à cette étape, comme les molécules NKG2D et NKp46. Les cellules vont fortement exprimer CD56. A ce stade, la cellule commence à acquérir les fonctionnalités caractéristiques des cellules NK : production d'IFN $\gamma$  et activité lytique dépendante de la perforine mais également par le biais des récepteurs de mort de la famille du TNF (comme TRAIL ou FasL). Durant cette étape, le facteur de transcription T-bet, indispensable à la maturation fonctionnelle des cellules NK, est exprimé de façon très

importante. Les caractéristiques phénotypiques du type cellulaire obtenu sont  $CD34^-/CD117^{+/-}/CD94^+$ .

Le stade 5 voit émerger les deux sous populations de cellules NK, à savoir la population  $CD56^{bright}CD16^{dim}$  et la population  $CD56^{dim}CD16^{bright}$ . L'expression du CD56 augmente progressivement du stade 2 au stade final. A ce moment, l'expression du CD16 apparaît. Les différentes étapes de la génération des cellules NK sont présentées dans la figure 1.



**Figure 1:** Les différents stades de développement des cellules Natural Killer (d'après Freud et Caligiuri [7])

### 1.2.2. Cas particuliers : développement des cellules NK dans les ganglions lymphatiques, le foie et le thymus

Il a également été montré que la moelle osseuse n'est pas le seul site de développement des cellules NK. Ainsi, le foie, le thymus et les ganglions lymphatiques peuvent être le siège du développement de certaines sous populations de cellules NK. Récemment, une population minoritaire de cellules NK, exprimant CD127 (IL-7R $\alpha$ ), a été trouvée dans le thymus. Cette génération se fait par une voie de signalisation particulière dépendante de GATA3 et

indépendamment des précurseurs T. Une autre caractéristique phénotypique des cellules NK d'origine thymiques est leur plus forte expression de CD69 par rapport aux cellules NK « classiques ». Les fonctions des cellules NK thymiques CD127<sup>+</sup> sont dépendantes de l'IL-7 et uniquement immuno-régulatrices chez la souris. Chez l'homme, leurs fonctions restent à être étudiées [7]. Dans les ganglions, la sous population de cellules NK CD56<sup>bright</sup> se développe à partir d'un précurseur hématopoïétique possédant le marqueur CD34 [8]. Des cellules NK immatures ont également été décrites dans le foie de souris [9].

### 1.3. Les récepteurs

Afin de discriminer les cellules cibles des cellules du soi non infectées ou anormales, les cellules NK utilisent un répertoire très important de récepteurs de surface. Ces récepteurs conditionnent l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices des cellules NK.

La perte de reconnaissance du soi se traduit par le fait que les cellules NK vont préférentiellement attaquer les cellules dont les molécules du CMH-I ont une expression dérégulée ou qui sont anormales [10]. La perte de l'expression du CMH-I est un événement rare qui intervient dans le processus tumoral de certains cancers.

Les récepteurs présents à la surface des cellules NK surveillent l'expression des molécules du CMH-I. Les récepteurs capables de reconnaître les molécules du CMH-I se divisent en deux familles distinctes. L'une de ces familles est constituée de récepteurs avec des domaines appartenant à la super famille des immunoglobulines (sf-Ig). Cette famille de récepteurs regroupe les molécules KIR (killer Ig-like receptor), les LILR (leucocyte immunoglobulin-like receptor) ou LIR (leucocyte inhibitory receptor) et les LAIR (leucocyte-associated inhibitory receptor). Pour la deuxième famille, les récepteurs s'apparentent aux lectines de type C.

L'engagement de ces récepteurs peut induire l'activation ou l'inhibition des fonctions sécrétrices et cytotoxiques des cellules NK. Alors que les lymphocytes T et B reconnaissent les antigènes exogènes par l'intermédiaire de récepteurs d'Ag spécifiques (TCR, Ac), l'état d'activation des cellules NK est régulé par la balance des signaux activateurs et inhibiteurs reçus d'un nombre fini de récepteurs membranaires activateurs et inhibiteurs. C'est cette balance qui va déterminer l'action des cellules NK.

### 1.3.1. La superfamille des immunoglobulines

#### 1.3.1.1. Les récepteurs KIR

Les récepteurs KIR sont exprimés par les cellules NK mais aussi par certaines sous populations de lymphocytes T [11]. Les KIR sont les principaux régulateurs du développement de la tolérance et de l'activation des cellules NK [12]. Les principaux ligands des récepteurs KIR sont les molécules du CMH-I (HLA-A, -B, -C). La tolérance des cellules NK vis-à-vis des cellules hôtes est permise grâce à l'interaction des molécules du CMH-I exprimées par ces cellules et les récepteurs KIR inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK.

La famille des récepteurs KIR est codée par 17 gènes hautement polymorphes (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5a, 2DL5b, 3DL1 à 3DL3, 2DS1 à 2DS5, 3DS1, KIR3DP1) (Tableau 1).

**Tableau 1** : Récepteurs des cellules NK pour les molécules CMH-I

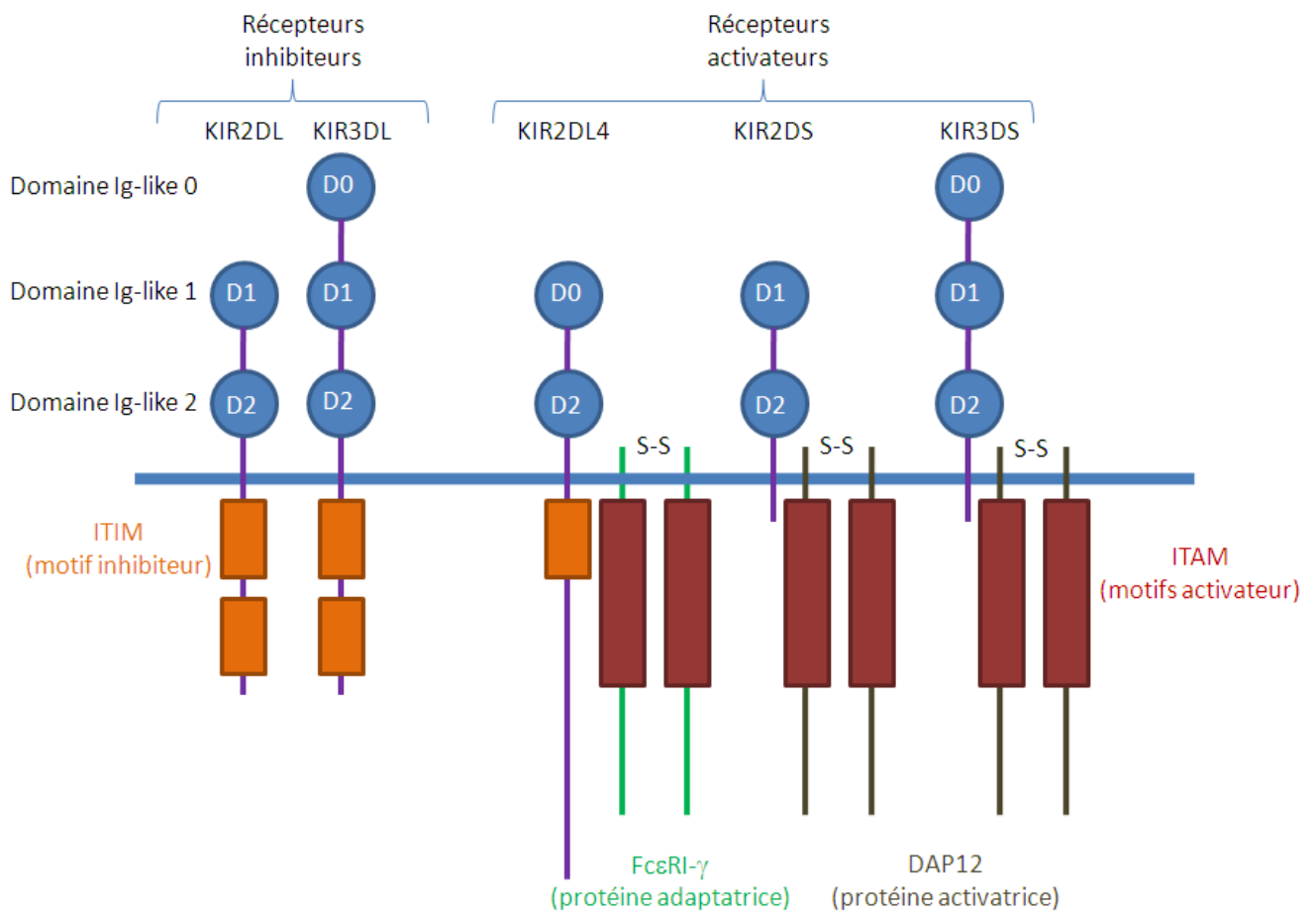
Gène	CD	Fonctions	Motif	Ligand
KIR2DL1	CD158a	Inhibition	ITIM	HLA-C S77/K80
KIR2DL2	CD158b1	Inhibition	ITIM	HLA-C S77/N80
KIR2DL3	CD158b2	Inhibition	ITIM	HLA-C S77/N80
KIR2DL4	CD158d	Activation ?	FcεRI	HLA-G ?
KIR2DL5a	CD158f	Inhibition	ITIM	?
KIR2DL5b		Inhibition	ITIM	?
KIR3DL1	CD158e1	Inhibition	ITIM	HLA-Bw4
KIR3DL2	CD158k	Inhibition	ITIM	HLA-E
KIR3DL3	CD158z	Inhibition	ITIM	?
KIR2DS1	CD158h	Activation	DAP12	HLA-C
KIR2DS2	CD158j	Activation	DAP12	?
KIR2DS3		Activation	DAP12	?
KIR2DS4	CD158i	Activation	DAP12	HLA-C
KIR2DS5	CD158g	Activation	DAP12	?
KIR3DS1	CD158e2	Activation	DAP12	?

Les récepteurs KIR sont des protéines transmembranaires de type I, caractérisés par le nombre de domaines Ig dont ils sont constitués (2D ou 3D) et par la longueur de leur extrémité intracytoplasmique (DS ou DL). Les extrémités longues (2DL et 3DL) possèdent des motifs

inhibiteurs appelés ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs). La phosphorylation du motif ITIM permet le recrutement de la phosphatase SHP-1, ce qui induit un signal inhibiteur. Les récepteurs KIR constitués d'une extrémité courte (2DS et 3DS) ne possèdent pas de motif ITIM. Ces récepteurs KIR activateurs sont associés à une protéine transmembranaire activatrice nommée DAP12 et possèdent, au niveau de leur domaine intracellulaire, un motif activateur ITAM (immunoreceptor tyrosin-based activation motifs). Le motif ITAM permet le recrutement d'une tyrosine kinase impliquée dans la génération d'un signal activateur après stimulation [13, 14].

La seule exception est le récepteur KIR2DL4 dont la longue extrémité intra cytoplasmique est activatrice (tableau 1). KIR2DL4 est uniquement exprimé par les cellules NK CD56<sup>bright</sup>, et n'est pas associé à DAP12 mais à un adaptateur FcεRI-γ contenant un motif ITAM [15].

Qu'ils soient inhibiteurs ou activateurs, les récepteurs KIR possèdent tous la même extrémité extra-cytoplasmique et peuvent donc lier les mêmes ligands [16] (Figure 2).



**Figure 2:** Représentation schématique des récepteurs activateurs et inhibiteurs de la famille KIR.

#### 1.3.1.2. Les récepteurs LIR

La famille des LIR est composée de 13 membres ayant une structure similaire aux récepteurs KIR car possédant également des domaines Ig-like. Les gènes codant ces récepteurs sont situés sur le bras long du chromosome 19. Les récepteurs LIR peuvent être classés en trois catégories. La première catégorie regroupe des récepteurs possédant des motifs ITIM (LIR-1, -2, -3, -5 et -8). La deuxième catégorie est constituée des récepteurs ayant une courte extrémité cytoplasmique et des résidus chargés dans leur région transmembranaire (LIR-6a, -6b et -7). La dernière catégorie regroupe un unique récepteur soluble (LIR-4) [17].

Les récepteurs LIR sont exprimés par plusieurs cellules, dont les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et T et les cellules NK [18]. Les récepteurs LIR-1, -2, -3, -4, -6a et -7 possèdent 4 domaines extracellulaires de type Ig-like alors que les LIR-5 et -6b en possèdent seulement deux. La présence de motifs ITIM dans la région cytoplasmique des LIR-1, -2, -3, -5 et -8 suggère que ces récepteurs ont une activité inhibitrice similaire aux récepteurs KIR [19].

#### 1.3.1.3. Les récepteurs LAIR

Les membres de cette famille sont des glycoprotéines de type II, homo ou hétérodimériques codées par des gènes situés sur le chromosome 19. Chaque chaîne compose le domaine extracellulaire de type lectine C (C-type lectin-like domain ou CTLD). Cette famille, constituée des molécules LAIR-1 et LAIR-2. Ces deux molécules possèdent des motifs ITIM, et vont donc induire un signal inhibiteur après activation.

LAIR-1 est une glycoprotéine transmembranaire de 32 kDa avec un seul domaine Ig-like extracellulaire et une extrémité cytoplasmique possédant des motifs ITIM. LAIR-1 est exprimé par la majorité des cellules mononucléées du sang (PBMC) et des thymocytes [20]. Le collagène est un ligand naturel de LAIR-1. Après activation, ce récepteur recrute, au niveau des motifs ITIM, les phosphatases SHP1 et SHP-2. LAIR-1 existe également sous forme soluble. L'activation de LAIR-1 entraîne une forte inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK [20]. Malgré de fortes ressemblances avec les récepteurs KIR, LAIR-1 ne reconnaît pas les molécules du CMH-I.

LAIR-2 est un récepteur soluble qui est sécrété après stimulation. Il interagit avec les mêmes ligands que LAIR-1 et joue le rôle d'antagoniste des fonctions de LAIR-1 [21].



### 1.3.2. La superfamille des lectines de type C

#### 1.3.2.1. Ly49

Les récepteurs qui reconnaissent les molécules du CMH-I sont totalement différents chez l'homme et la souris. Chez l'homme, ce sont les récepteur KIR qui sont responsables de la reconnaissance des molécules HLA-A, -B, -C. Chez la souris, le principal récepteur qui reconnaît les molécules du CMH-I est le récepteur Ly49 [22]. Ly49 est également codé par un gène (*Ly49L*) présent dans le génome humain, mais la protéine produite n'est pas fonctionnelle [23].

Ly49 est un récepteur transmembranaire de type 2 surtout exprimé par les cellules NK sous forme d'homodimère. Le domaine extracellulaire est très conservé parmi les membres de la famille Ly49 et est constitué d'un domaine Natural Killer (NKD) responsable de la liaison au ligand. La partie intracellulaire du récepteur est constituée d'un motif inhibiteur ITIM. Les cellules NK murines expriment au moins 7 récepteurs Ly49 inhibiteurs [24], Ly49A, -B, -C, -E, F, -G<sub>2</sub> et I.

Il existe deux récepteurs activateurs dans la famille Ly49, Ly49D et Ly49H. Ces deux récepteurs ne possèdent pas de motif ITIM intracellulaire mais un résidu arginine dans la région transmembranaire qui interagit avec les protéines adaptatrices DAP10/DAP12, qui, elles, possèdent un motif activateur ITAM [25].

#### 1.3.2.2. CD94/NKG2

Les gènes codant les récepteurs NKG2 se situent sur le « complexe NK » du chromosome 12 chez l'homme et du chromosome 6 chez la souris [26, 27]. Les gènes de ce complexe codent pour des récepteurs de type II lectine-like. D'autres gènes se retrouvent dans ce complexe NK, comme ceux codant pour CD69 et CD94.

Les récepteurs CD94/NKG2 sont des lectines de type C, constituées d'hétérodimères reliés par des ponts disulfures. Ce sont des récepteurs transmembranaires exprimés par les cellules NK et quelques sous populations de lymphocytes T. La sous unité CD94 du récepteur est invariante. La sous unité NKG2 regroupe 5 protéines, NKG2A (et son variant NKG2B), NKG2C, NKG2D, et NKG2E. Les domaines extracellulaires des sous unité NKG2A/B, -C et -E possèdent un haut degré d'homologie. La partie intracellulaire peut être longue

(NKG2A/B) ou courte (NKG2C et -E), correspondant respectivement, aux activités inhibitrices ou activatrices des récepteurs CD94/ NKG2.

#### 1.3.2.3. NKG2D

Le récepteur NKG2D a été identifié en 1991 comme un récepteur orphelin (PMID:2007850). C'est une lectine de type C qui a également été identifiée chez d'autres espèces, dont la souris, le rat et le porc. Sa séquence en acides aminés est très conservée entre les espèces (entre 52% et 78% d'homologie pour la protéine entière et entre 72% et 90 % pour le domaine lectine). Les fonctions de NKG2D ont été identifiées à partir de 1999 par des chercheurs travaillant sur les ligands MICA et MICB [28], ainsi que par une équipe qui travaillait sur la signalisation *via* la protéine adaptatrice DAP10 [29].

Contrairement aux autres récepteurs NKG2, NKG2D n'est pas co-exprimé avec CD94. Il se retrouve sous forme d'homodimères à la surface des cellules NK [29]. Il n'a que 21% d'homologie avec les autres membres de la famille NKG2 et possède des fonctions très différentes.

NKG2D est exprimé principalement par les cellules NK mais aussi par les cellules NKT, certains types de lymphocytes T  $\gamma\delta$ , les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, et certains lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

NKG2D est un récepteur activateur. Un certain nombre de ses ligands ont été identifiés, dont MICA et MICB.

##### 1.3.2.3.1. Les fonctions de NKG2D

L'activation de NKG2D par les cellules NK entraîne une activité cytolytique. Cette fonction a été démontrée en utilisant des cellules transfectées avec des ligands de NKG2D comme les protéines MIC, Rae\*1 ou H-60. Il a été observé une forte cytotoxicité vis-à-vis de ces transfectants, contrairement aux cellules non transfectées et n'exprimant pas les ligands de NKG2D [30-32].

##### 1.3.2.3.2. Les ligands MICA et MICB

MICA et MICB sont des molécules de surfaces apparentées aux molécules CMH-I et sont surexprimées par des cellules ayant subi un stress, infectées ou tumorales [33, 34].

#### 1.3.2.4. CD69

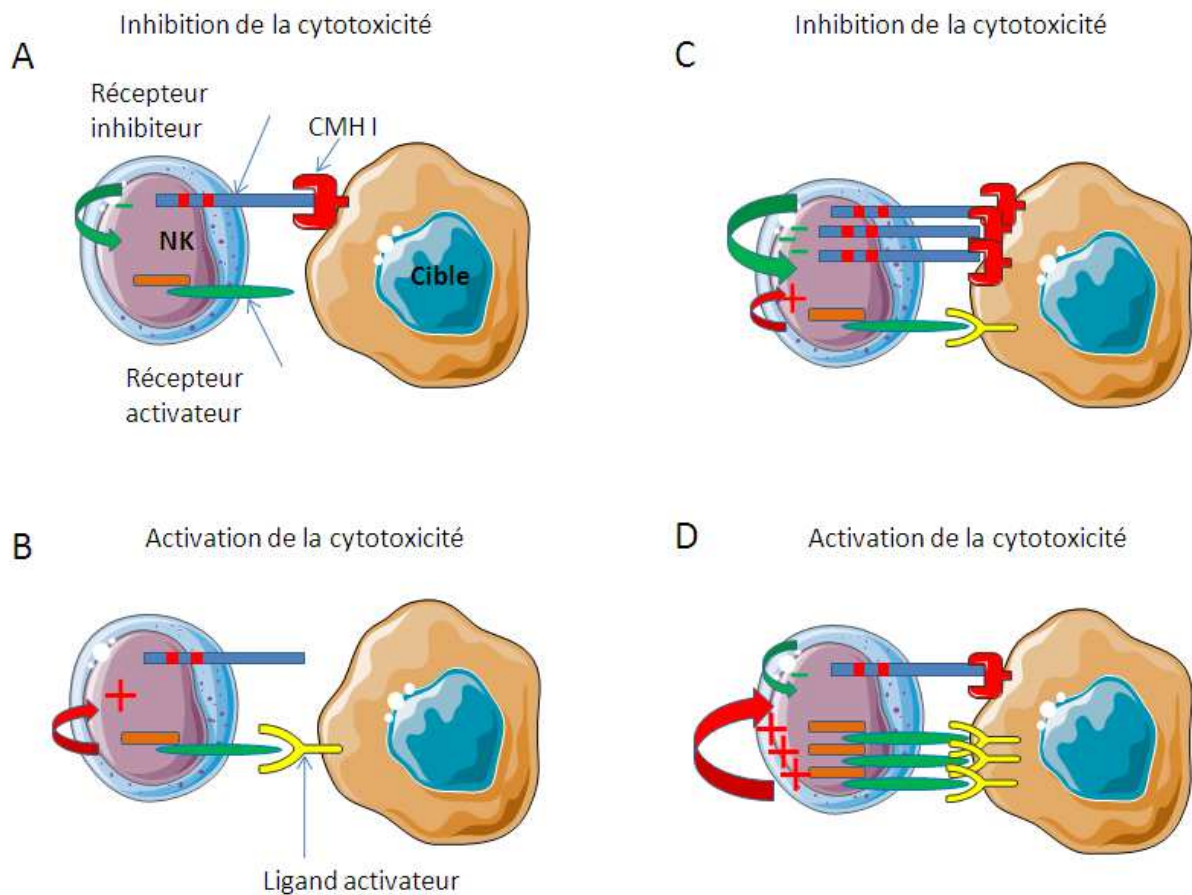
CD69 est un récepteur de type lectine de type C. Il est exprimé après activation par la majorité des cellules immunitaires et notamment par les cellules NK en réponse à l'IL-2 [35]. Une fois exprimé par les cellules NK, CD69 agit comme une molécule co-stimulatrice permettant la prolifération, la sécrétion et/ou une activité cytotoxique [36].

### 1.4. Les principales fonctions des cellules NK

#### 1.4.1. La cytotoxicité

Les molécules du CMH-I peuvent être considérées comme des indicateurs positifs de l'intégrité cellulaire. Les cellules NK tuent principalement les cellules dont l'expression du CMH-I est absente ou anormale (c'est-à-dire ne correspondant pas au CMH-I du soi) [37, 38]. Il existe donc des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK qui reconnaissent ces molécules du CMH-I modifiées ou non (KIR, LIR ...). L'activation des fonctions cytotoxiques des cellules NK se fait après l'intégration de plusieurs signaux, générés par l'engagement ou non des récepteurs inhibiteurs et activateurs [39]. C'est la balance des signaux activateurs et inhibiteurs qui va déclencher ou non la réponse cytotoxique (Figure 3). Les récepteurs de la cytotoxicité naturelle des cellules NK reconnaissent des ligands qui ne sont pas des molécules du CMH-I. Ces ligands sont exprimés à la fois par les cellules saines et par les cellules anormales. Ces récepteurs sont les molécules NKp46, NKp30 et NKp44. Ce sont des récepteurs activateurs qui ont la particularité de posséder un motif ITAM dans leur domaine intracellulaire. Ce motif ITAM est commun à tout les récepteurs activateurs ; il est soit présent sur la molécule soit le récepteur s'associe à une molécule exprimant ce motif ITAM.

A noter que les récepteurs KIR possédant une extrémité intracytoplasmique sont activateurs car ils sont liés à la protéine adaptatrice DAP12 qui possède un motif ITAM (Figure 2). Ces récepteur KIR activateurs sont aussi appelés récepteur KAR.



**Figure 3** : Régulation de la cytotoxicité des cellules NK par les récepteurs activateurs et inhibiteurs.

La cytotoxicité des cellules NK dépend de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs. **A**, En l'absence d'interaction entre un récepteur activateur et son ligand, la cytotoxicité est inhibée par la reconnaissance du complexe CMH-I par les récepteurs inhibiteurs (ex : KIR). **B**, La fonction cytotoxique est activée quand il y a une interaction entre un récepteur activateur et son ligand, en l'absence d'une reconnaissance du CMH-I par un récepteur inhibiteur. Lorsque les interactions inhibitrices sont plus nombreuses que les signaux activateurs, la cytotoxicité des cellules NK est inhibée (**C**) alors que, à l'inverse, lorsque les interactions activatrices sont plus nombreuses, la balance penche en faveur d'une activation de la cytotoxicité (**D**).

Une fois le processus cytotoxique engagé, les voies de mort utilisées par les cellules NK sont principalement de deux types :

- Soit la lyse est calcium dépendante et fait intervenir des granules de sécrétion, issues des lysosomes, contenant des enzymes lytiques.
- Soit la lyse est indépendante du calcium et fait intervenir les récepteurs de mort de la famille du TNF, tels que FasL et TRAIL [40, 41].

#### 1.4.1.1. Les granules lytiques

Les granules lysosomiales contiennent des enzymes lytiques telles que granzyme et perforine [42], des sérines protéases, telles que granzyme A-H, K et M, et des protéoglycanes, comme la serglycine. Ces différentes enzymes vont déstabiliser et perforer la membrane plasmique des cellules cibles. Le pH acide des granules rend inactives la plupart des enzymes lytiques. Pour empêcher une action prématurée des enzymes non sensibles au pH, les granules lytiques contiennent également des inhibiteurs, tels que la calréticuline qui inhibe la perforine. Enfin, les granules contiennent des enzymes responsables du métabolisme des enzymes lytiques, comme les cathepsines C et B. A noter que les granules présentent à leur surface la molécule FasL.

##### 1.4.1.1.1. Granzymes

Le terme granzyme désigne des enzymes contenues dans des granules. Les granzymes sont des sérines protéases exprimées par les cellules NK et les lymphocytes T activés. Chez l'homme, 5 gènes codent pour des granzymes nommées A, B, H, K et M. Les granzymes A et K clivent leurs cibles après un résidu basique [43], la granzyme H clive sa cible après un résidu aromatique [44, 45], et la granzyme M après un résidu aliphatique en position P1 [46].

##### 1.4.1.1.2. Perforine

La perforine est contenue dans les granules de sécrétion des cellules NK et est sécrétée suite à une activation pro-cytotoxique des cellules [47-49]. Les fonctions de la perforine restent sujettes à débat. En effet, les premières études sur la perforine ont montré qu'elle était indispensable à l'action des molécules lytiques, telles que les granzymes, en permettant la formation de pores dans la membrane plasmique de la cellule cible [50]. Cependant, des études plus récentes ont montré que la perforine n'était pas indispensable à l'action des granzymes et que les pores formés n'étaient pas suffisants grands pour permettre l'entrée de molécules de grande taille, comme les granzymes [51, 52].

#### 1.4.1.2. La famille du TNF

Les cellules NK expriment des membres de la famille du TNF tel que : TNF $\alpha$ , lymphotoxine  $\alpha$ , lymphotoxine  $\beta$ , FasL, CD27L, CD30L, OX40, 4-1BBL et TRAIL [53, 54].

##### 1.4.1.2.1. FasL

Fas ligand (FasL) est une glycoprotéine membranaire de type II de 40 kDa. FasL est exprimée par un nombre limité de types cellulaires, incluant les lymphocytes T activés, les cellules NK, les cellules de Sertoli et les cellules épithéliales de la cornée [55-57].

FasL agit avec le ligand Fas, exprimé par les cellules cible. L'interaction Fas/FasL, en plus de la lyse des cellules infectées ou anormales, est également impliquée dans l'homéostasie des cellules immunitaires. En effet, ce mécanisme complexe permet de limiter l'expansion clonale des cellules T après la phase effectrice de la réponse immune et d'inactiver les cellules T auto-réactives qui ont échappé à la sélection thymique.

##### 1.4.1.2.2. TRAIL

TRAIL est un récepteur transmembranaire de type 2. Il a une forte homologie avec FasL (28% d'acides aminés dans la partie extracellulaire) au niveau du site de liaison avec son ligand TRAIL-R. L'extrémité cytoplasmique de TRAIL est très courte et comprend 17 résidus d'acides aminés. Une faible proportion de TRAIL est retrouvée sous forme soluble, après clivage par des cystéines protéases.

TRAIL peut se lier à deux récepteurs qui vont induire la mort cellulaire, TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5), ainsi qu'à deux autres récepteurs qui ne peuvent pas transduire un message de mort, TRAIL-R3 (LIT, DcR1) et TRAIL-R4 (TRUNDD, DcR2). Il existe également un récepteur soluble capable de lier TRAIL, l'ostéoprotégérine (OPG).

TRAIL est exprimé par de nombreuses cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Son expression dépend de l'état d'activation de la cellule. L'expression de TRAIL est augmentée sur les monocytes et les macrophages stimulés avec du LPS ou de l'IFN $\beta$  [58, 59]. L'IFN $\gamma$  peut induire l'expression de TRAIL par les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules NK [60, 61].

#### 1.4.1.2.3. Mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par FasL et TRAIL

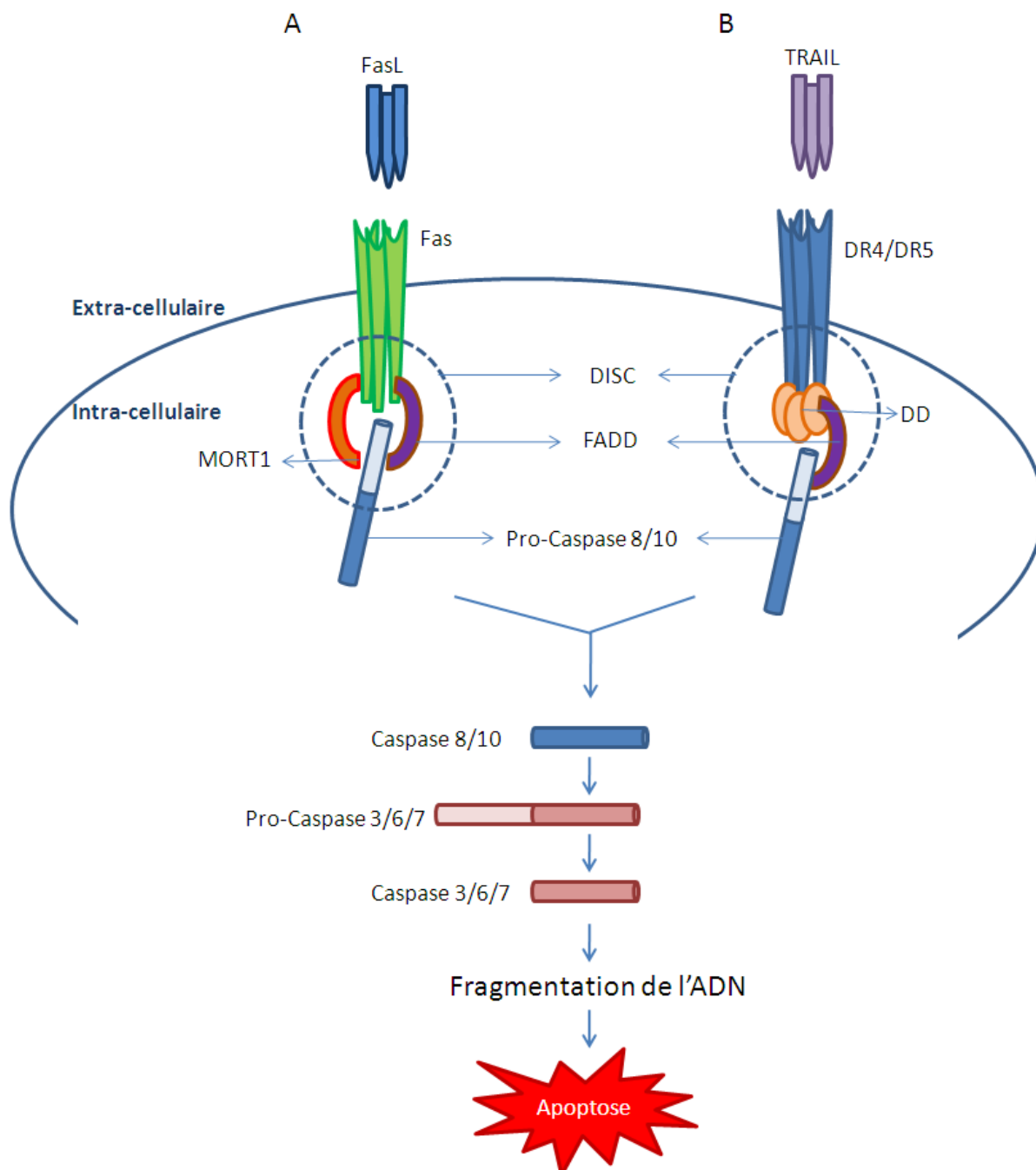
Les mécanismes moléculaires induits par TRAIL et FasL aboutissant à l'apoptose de la cellule cible font intervenir les caspases. Les caspases clivent leur substrat après un résidu aspartate et peuvent être divisées en trois groupes. Le groupe 1 clive après une séquence consensus WEHD. Le groupe 2 (caspases 2, 3, 7) reconnaît la séquence DExD. Le groupe 3 (caspase 6, 8 et 9) reconnaît la séquence (IVL)ExD.

La première étape de l'apoptose induite par TRAIL correspond à sa liaison avec TRAIL-R1 et TRAIL-R2 qui induit la trimérisation du récepteur et l'arrimage au complexe DISC (death-inducing signaling complex) [62]. La protéine adaptatrice FADD (Fas associated death domain) est alors recrutée au niveau du complexe DISC *via* l'interaction avec les domaines de mort (death domain ; DD) des récepteurs TRAIL-R1 et -R2. FADD va également recruter les caspases 8 et 10 au complexe DISC où elles sont à leur tour activées. Cette activation marque le départ d'une cascade de signalisation impliquant la voie des caspases aboutissant, *in fine*, à la fragmentation de l'ADN (Figure 4).

TRAIL induit une apoptose rapide vis-à-vis des cellules tumorales. Par exemple, l'ADN des cellules Jurkat est dégradé deux heures après la liaison de TRAIL avec le récepteur [63, 64].

Le mécanisme apoptotique induit par l'interaction Fas/FasL est sensiblement le même que pour TRAIL. Suite à l'interaction avec FasL [65, 66], la mort cellulaire survient après activation d'une voie de signalisation dépendante de Fas.

La mort cellulaire fait suite à l'engagement (trimérisation) de Fas et nécessite le recrutement de la pro-enzyme caspase 8 (aussi connue sous le nom FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme ou FLICE) [67, 68]. L'association Fas / caspase 8 est permise grâce à la protéine adaptatrice TRADD/MORT1 (TNF receptor-associated death domain/mediator of receptor-induced toxicity). Cette trimérisation va activer la caspase 8 et former le complexe DISC et entraîner l'activation d'une cascade de signalisation avec notamment l'activation de la caspase 3 [69] (Figure 4). L'apoptose induite par Fas/FasL est très rapide.



**Figure 4** : Voie intracellulaire de mort cellulaire *via* les récepteurs DR4/DR5 ou Fas.

**A**, La trimérisation de Fas suite à l'interaction de FasL induit l'activation de la caspase 8 médiée par la protéine adaptatrice FADD/MORT1 au niveau du complexe DISC. L'activation de la caspases 8 est responsable de l'activation de la voie des caspases et notamment de la caspase 3. Il y a alors fragmentation de l'ADN et l'apoptose de la cellule.

**B**, La liaison de TRAIL à l'homodimère DR4/DR5 entraîne la trimérisation du récepteur. La protéine adaptatrice FADD va alors interagir avec le domaine de mort (DD) et permettre l'activation des caspases 8 et 10 au niveau du complexe DISC. Il s'ensuit une cascade de signalisation aboutissant à la fragmentation de l'ADN et l'apoptose de la cellule.



#### 1.4.1.3. La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

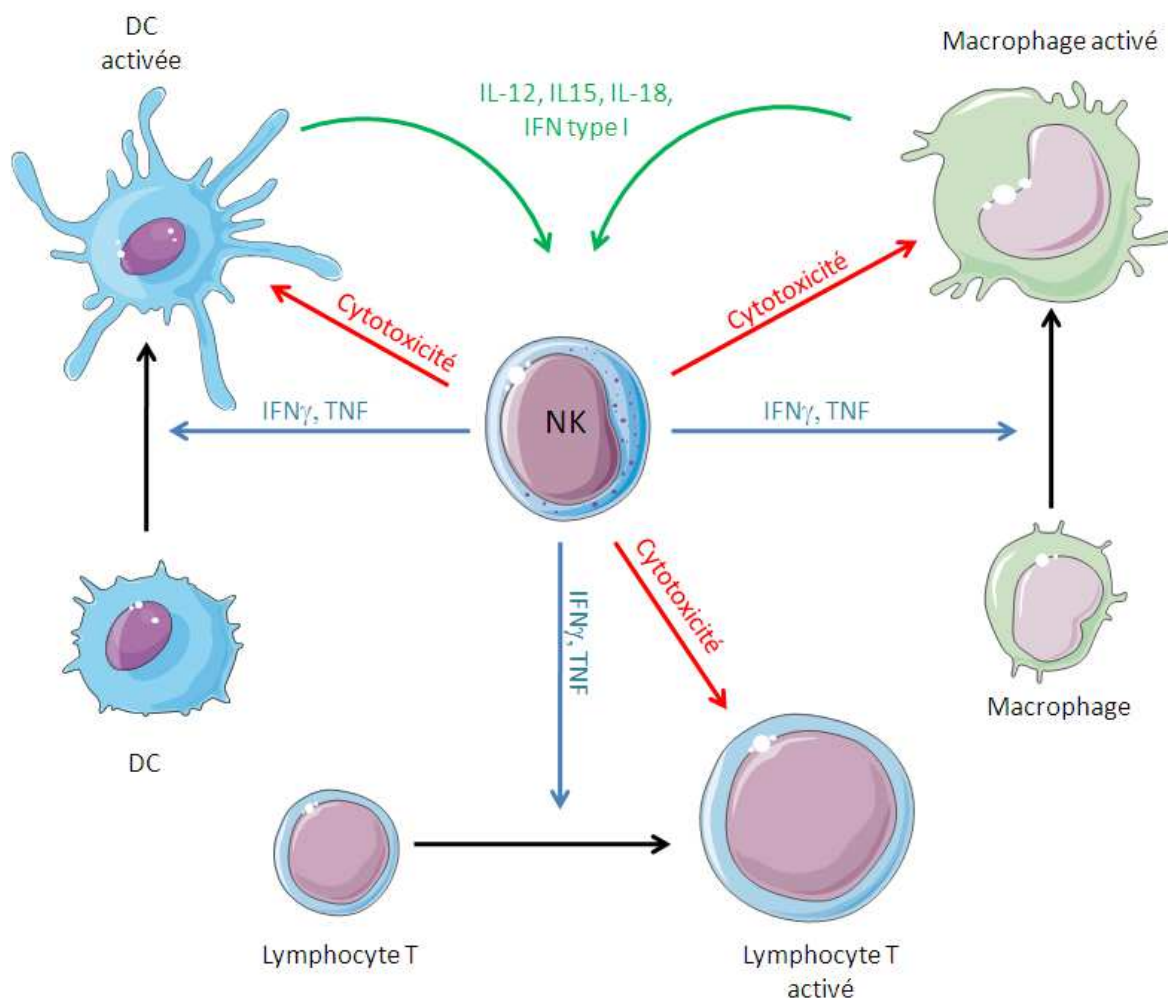
Les cellules NK peuvent également lyser une cellule cible par le biais d'anticorps. Les anticorps reconnaissent une molécule de surface sur la cellule cible. Le fragment Fc de ces anticorps est alors reconnu par le récepteur CD16 présent à la surface des cellules NK.

Les récepteurs humains pour les IgG (Fc $\gamma$ R) sont divisés en trois classes, appelées Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) et Fc $\gamma$ RIII (CD16) [70]. Deux isoformes du CD16 ont été identifiées, Fc $\gamma$ RIIIA et B. L'isoforme A est un récepteur transmembranaire. Il est exprimé par les cellules NK, une petite population de lymphocytes T ainsi que par les monocytes et les macrophages. Fc $\gamma$ RIIIA est impliquée dans l'ADCC, la phagocytose, l'endocytose et la sécrétion de cytokines. L'isoforme B est ancrée dans la couche externe de la membrane plasmique des neutrophiles par un motif glycosylphosphatidylinositol (GPI). Fc $\gamma$ RIIIB est impliqué dans la dégranulation [71].

Les cellules NK expriment plus ou moins fortement le CD16 (ou Fc $\gamma$ RIII) en fonction de leur capacités cytotoxiques. Après reconnaissance du fragment Fc par le CD16 les cellules NK vont sécréter des cytokines, telles que l'IFN $\gamma$ , ainsi que des granules lytiques contenant perforine et granzyme, entraînant l'apoptose de la cellule cible.

#### 1.4.2. L'activité immuno-régulatrice

Les cellules NK sont les seules cellules lymphoïdes (avec les cellules NKT) appartenant au versant inné de la réponse immunitaire. Ces cellules ont un rôle important dans l'initiation et l'orientation de la réponse immune adaptative. Dans des conditions inflammatoires, elles produisent rapidement différentes cytokines qui vont moduler les autres types cellulaires de l'immunité. Les cellules NK agissent alors comme des cellules régulatrices et influencent les autres types cellulaire, tels que les DC et les lymphocytes T et B. Les cellules NK participent aussi à l'homéostasie des cellules immunitaires, par exemple en favorisant la maturation et l'activation des DC, des macrophages et des lymphocytes et en éliminant les DC immatures, les macrophages hyper-activés et les lymphocytes T activés (Figure 5).



**Figure 5 :** Régulation des réponses immunes par les cellules NK.

Suite à une stimulation par différents facteurs solubles tels que IL-12, IL-15, IL-18 ou les IFN de type I (flèches vertes), les cellules NK favorisent la maturation et l'activation des DC, macrophages et des lymphocytes T (flèches bleues). Cependant, les cellules NK peuvent éliminer les DC immatures, les lymphocytes T activés et les macrophages hyper-activés (flèches rouge) (d'après Vivier *et al* [72]).

#### 1.4.2.1. Les récepteurs aux cytokines

Les cellules NK expriment constitutivement des récepteurs à différentes cytokines. Le récepteur hétérodimérique à l'IL-2 (IL-2R $\beta\gamma$ ) est, par exemple, fortement exprimé par les cellules NK au repos [73]. D'autres récepteurs aux cytokines sont également exprimés constitutivement par les cellules NK, tels que les récepteurs à l'IL-15, l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-18 [74-77].

#### 1.4.2.2. La production de cytokines

Les cellules NK  $CD56^{bright}CD16^{dim}$  sont la première source de production de cytokines immuno-régulatrices comme l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$ , l'IL10, l'IL-13 et le GM-CSF contrairement aux cellules NK  $CD56^{dim}CD16^{bright}$  dont l'activité productrice de cytokines est négligeable [2]. Pour une production optimale de cytokines, les cellules NK doivent recevoir plusieurs stimuli simultanément. Ainsi, la combinaison IL-12 plus IL-18 entraîne une très forte production d'IFN $\gamma$ , la combinaison IL-15 plus IL-18 permet une forte production de GM-CSF et la combinaison IL-15 plus IL-12 induit la production d'IL-10 [2].

Les cellules NK peuvent être classées en fonction de leur profil cytokinique. Les cellules NK1 produisent de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-10 et du TNF $\beta$  alors que les cellules NK2 produisent préférentiellement de l'IL-5 et de l'IL-13 [78].

#### 1.4.2.3. Les récepteurs aux chimiokines

Les récepteurs aux chimiokines sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Ils se classent en quatre familles, les récepteurs CXC, CC, CX3C et C en fonction du nombre et de l'espacement des résidus cystéines dans leurs séquences. Un même récepteur peut interagir avec plusieurs chimiokines.

Les différentes études menées sur l'expression des récepteurs CXC et CX3C par les cellules NK sont contradictoires. Certaines études rapportent que les cellules NK  $CD56^{dim}CD16^{bright}$  expriment fortement CXCR1, CXCR4 et CX3CR1 et faiblement CXCR2 et CXCR3 [79, 80], tandis que d'autres auteurs ont montré que ces mêmes cellules expriment CXCR4 mais pas CXCR1, CXCR2, CXCR3 ou CX3CR1 [81, 82]. Les cellules NK  $CD56^{bright}CD16^{dim}$  expriment peu ou pas CXCR1, -2 et CX3CR1 [79].

En ce qui concerne l'expression des autres familles de récepteurs aux chimiokines par les cellules NK, CCR1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8 et -9 sont peu ou pas exprimés par les cellules NK non activées. En revanche après activation (avec de l'IL-15 ou de l'IL-2, par exemple), l'expression de CCR2, -4, -5 et -8 augmente significativement [81] [83]. Les cellules NK  $CD56^{bright}CD16^{dim}$  ont des niveaux élevés de CCR5 et CCR7 [84].

#### 1.4.2.4. Les chimiokines

Les chimiokines font partie de la plus large famille de cytokines connue (au moins 47 membres connus). Ces molécules se classent, comme les récepteurs, en 4 familles, CXC, CC, CX3C et C en fonction du nombre et de l'espacement des résidus cystéines dans leurs séquences. Les chimiokines exercent leurs effets biologiques *via* les récepteurs aux chimiokines. Une même chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs différents.

Les chimiokines ont, comme principale fonction, une activité chimiotactique. Les cellules NK migrent en réponse à CXCL9, CXCL10, CXCL11 (ligands de CXCR3) et CXCL12 (ligand de CXCR4) [82, 85]. Les cellules NK migrent également en réponse aux chimiokines de la famille CC, CCL-2, -3, -4, -5, -7 et -8 [82, 86], bien que leurs récepteurs connus ne soient pas détectables sur les cellules NK [79, 81, 83].

En plus de répondre à certaines chimiokines, les cellules NK en produisent, et cette production de chimiokines varie selon l'état d'activation des cellules NK (Tableau 2).

**Tableau 2** : Chimiokines produites par les cellules NK (d'après Robertson *et al* [87])

Chimiokines	Cellules NK au repos	Cellules NK activées
XCL1		+
CCL1	ND	+
CCL3	+/-	+
CCL4	+	+
CCL5	+	+
CCL22	+	+
CXCL8	Utérines	+

#### 1.4.2.5. Le dialogue entre les cellules NK et les cellules dendritiques

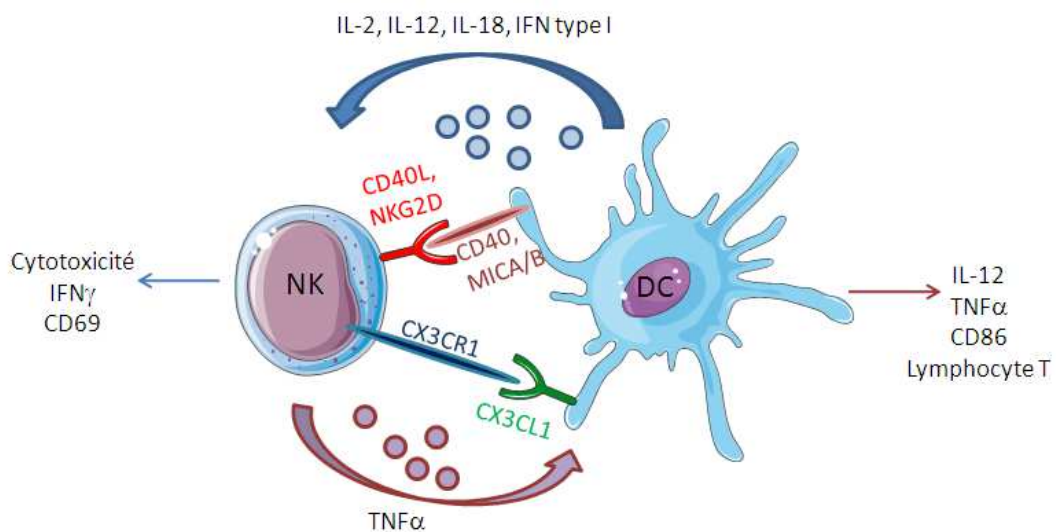
Le dialogue entre les cellules NK et les cellules dendritiques (DC) a été décrit pour la première fois en 1999 par Fernandez *et al*. Les auteurs ont montré que la réponse anti-tumorale des cellules NK murines était favorisée par les DC *in vivo* [88].

Les cellules NK au repos peuvent être activées par les DC. *In vitro*, cette activation nécessite un contact direct entre les deux types cellulaires et implique certainement des facteurs solubles. Les molécules de surface impliquées dans la reconnaissance dépendante d'un contact cellulaire sont par exemple CD40L, NKG2D, NKp46 ou CD28 côté cellule NK et

CD40, MICA/B, les molécules de la famille B7 coté DC [89, 90]. Les cytokines IL-2, IL-12, IL-18 ou les IFN de type I sont nécessaires à plusieurs fonctions effectrices des cellules NK [88, 91, 92]. Le stade de maturation des DC pourrait également influencer leur faculté à activer les cellules NK [91, 92].

L'activation des cellules NK par les DC se traduit par une augmentation de la production d'IFN $\gamma$ , une potentialisation de leur cytotoxicité mais aussi par l'augmentation de l'expression du CD69.

Le dialogue entre les cellules NK et les DC se fait également dans l'autre sens, les cellules NK pouvant activer les DC. L'activation des DC par les cellules NK nécessite à la fois un contact cellulaire *via*, par exemple, CX3CL1 côté DC et CX3CR1 côté cellule NK [93] et la production de TNF $\alpha$  par les cellules NK. Les cellules NK stimulées par IL-2 sont de bon activateurs des DC en présence ou non d'un co-stimuli tel que le LPS [94]. Les DC activées en présence de cellules NK ont une production accrue d'IL-12 et de TNF $\alpha$ , une augmentation de l'expression du CD86, et cette coopération entre les cellules NK et les DC favorise la réponse lymphocytaire T (Figure 6).



**Figure 6** : Dialogue entre les cellules NK et les DC.

Les cellules NK et les DC peuvent s'activer réciproquement l'une l'autre. Ce dialogue implique un contact cellulaire (par exemple *via* les molécules CD40L/CD40, NKG2D/MIC, CX3CR1/CX3CL1) et la production de cytokines, telle que IL-2, IL-12, IL-18, ainsi que les IFN de type I par les DC et par la production de TNF $\alpha$  par les cellules NK. Ces différentes interactions peuvent aboutir à une augmentation de la cytotoxicité, de la production d'IFN $\gamma$  et de l'expression de CD69 par les cellules NK et par une augmentation de la production de cytokines, de l'expression de CD86 et de la modulation des propriétés d'activation des lymphocytes T.

### 1.4.3. Les cellules NK mémoires

Les cellules NK sont considérées comme faisant partie de l'immunité innée car, contrairement aux cellules de l'immunité adaptative (lymphocyte T et B), les cellules NK ne possèdent pas la recombinaison RAG qui permet le réarrangement des gènes codant les récepteurs spécifiques des antigènes. La recombinaison RAG permet de générer une multitude de récepteurs antigéniques par les lymphocytes T et les lymphocytes B [95]. L'activation de ces récepteurs par les antigènes spécifiques entraîne une sélection et une amplification clonale des cellules T et/ou B. A l'issue de la phase effectrice, la majorité des lymphocytes meurent. Seul un faible pourcentage de cellules survivra, constituant le pool de cellules mémoires. Dans le cas où le même antigène pointe le bout de son nez, il sera reconnu plus rapidement et la réponse immune sera plus rapide. Cette mémoire immunitaire est caractéristique de l'immunité adaptative et prévient les infections récurrentes [96].

Jusqu'à récemment, la fonction « mémoire » était uniquement attribuée aux cellules de l'immunité adaptative (les lymphocytes T et B). Mais plusieurs indications suggèrent que certaines populations de cellules NK peuvent se comporter comme des cellules de l'immunité adaptative. Par exemple, des souris déficientes en cellules T et B peuvent quand même acquérir une réponse mémoire spécifique d'un antigène ; une sous population de cellules NK hépatiques serait le support de cette mémoire immunitaire [97, 98].

Chez la souris les cellules NK hépatiques peuvent développer une réponse mémoire dirigée contre les antigènes de plusieurs virus dont, le virus influenza, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou le virus humain de l'immunodéficience acquise de type 1 (HIV-1), alors que les cellules NK issues de la rate ne le peuvent pas. Cette réponse mémoire est dépendante du récepteur CXCR6 exprimé par au moins la moitié des cellules NK hépatiques [99, 100].



Les cellules NK ont une biologie très complexe et beaucoup d'études sont encore nécessaires pour appréhender pleinement le rôle de ces cellules dans les différents processus physiologiques et pathologiques. Ils représentent à la fois un acteur cellulaire majeur de la première ligne de défense mise en œuvre par le système immunitaire, et ils se comportent aussi comme des cellules régulatrices en orientant les réponses immunes, en fonction du type

d'agression. Plusieurs systèmes peuvent avoir une influence sur la biologie des cellules NK, leur cytotoxicité ou leur activité régulatrice. Parmi ces systèmes, il en est un dont les effets sur les cellules de l'immunité innée et en particulier sur les cellules NK, n'ont pratiquement pas été étudiés, il s'agit du système endocannabinoïde.

## 2. Le Système endocannabinoïde

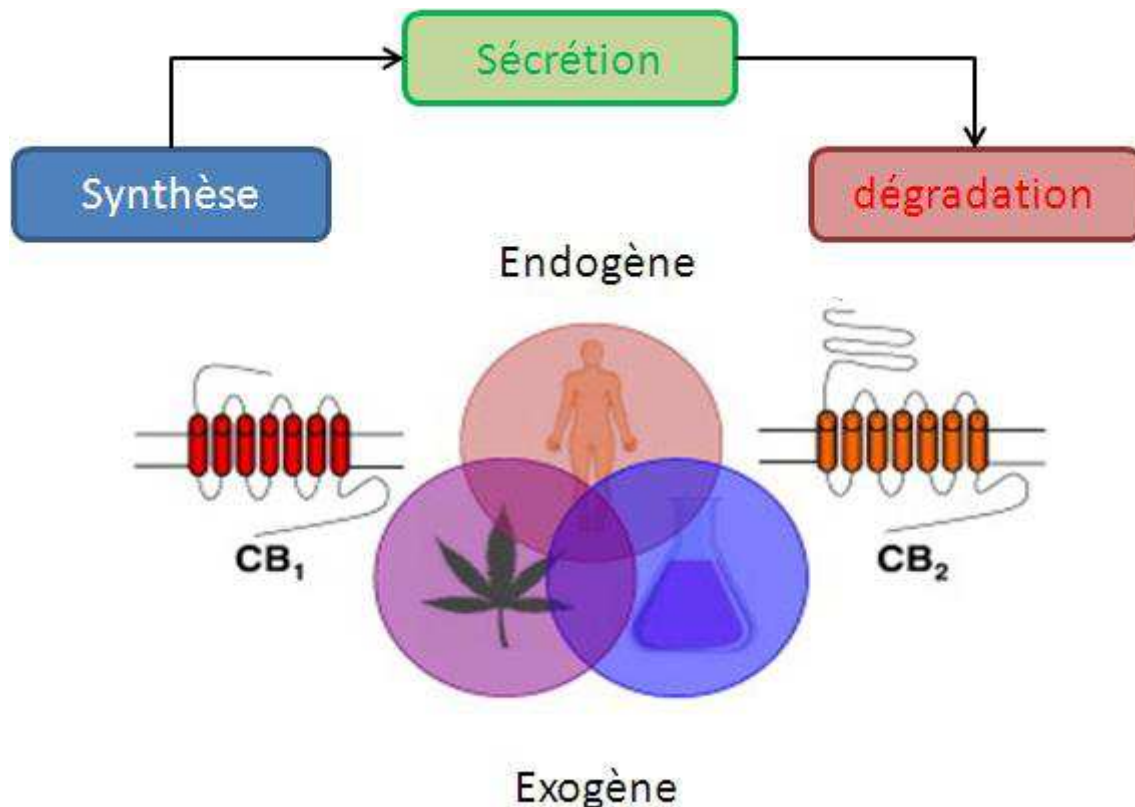
### 2.1. Généralités

Les propriétés thérapeutiques et récréatives du cannabis (*Cannabis sativa*) sont connues depuis plusieurs siècles, mais la compréhension du mécanisme moléculaire du mode d'action n'a débuté qu'à partir des années 1970. La découverte en 1971 [101], du composant psychoactif majeur du *Cannabis sativa*, la molécule lipidique  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), a laissé supposer l'existence d'un ou plusieurs récepteurs endogènes spécifiques du THC et de ses analogues endogènes, les endocannabinoïdes. Mais ce n'est qu'en 1988 qu'un premier récepteur endocannabinoïde, nommé cannabinoid receptor 1 (CB1), a été caractérisé [102] puis cloné en 1990 [103]. Trois ans plus tard, un second récepteur, appelé cannabinoid receptor 2 (CB2), a été identifié et caractérisé [104]. Récemment un autre récepteur, TRPV1 a été identifié comme pouvant fixer les ligands endocannabinoïdes. Cependant, ce récepteur, qui est un canal ionique, n'est pas classé dans la famille des récepteurs cannabinoïdes mais dans celle des « vanilloid receptors » [105].

Le premier ligand endocannabinoïde découvert fut l'Anandamide (*N*-arachidonoyl-éthanolamide, AEA) en 1992 [106], suivi par l'identification d'un deuxième ligand déjà connu mais dont la fonction restait inconnue, le 2-AG (2-arachidonoylglycerol) [107]. Ces deux ligands ont une forte affinité pour CB1 et CB2, mais seul l'AEA semble avoir une affinité avec TRPV1 [105]. D'autres ligands endocannabinoïdes ont été identifiés ces 10 dernières années, dont les principaux sont le 2-arachidonoyl-glycerol ether (noladin ether) [108], le *N*-arachidonoyl-dopamine (NADA) [109] et la virodhamine [110]. L'activité pharmacologique et le métabolisme de ces lipides endocannabinoïdes sont encore obscurs. Des investigations plus poussées sur leurs rôles et leurs fonctions sont donc nécessaires.

Le système endocannabinoïde est également constitué d'enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation des ligands. L'enzyme FAAH (Fatty acid amine hydrolase) est responsable de la dégradation de l'AEA, mais elle n'a aucun effet sur l'anabolisme du 2-AG [111]. La principale enzyme de dégradation du 2-AG est la monoacylglycérol lipase (MAG

lipase) [112]. Les voies de synthèse de ces deux endocannabinoïdes sont relativement différentes. Les enzymes responsables de la synthèse de l'AEA sont la N-acylphosphatidylethanolamine-selective phospholipase D (NAPE-PLD), l' $\alpha,\beta$ -hydrolase domaine 4 (ABHD-4) et la tyrosine-protéine phosphatase non-récepteur type 22 (PTPN22) [113]. Une seule enzyme conduit à la synthèse du 2-AG, la diacylglycerol lipase  $\alpha$  (DAGL $\alpha$ ) [111] (Figure 7)



**Figure 7** : Représentation schématique du système endocannabinoïde.

Les ligands ont une origine endogène ou exogène. Les deux agonistes les plus étudiés sont l'AEA et le 2-AG. Les deux récepteurs principaux sont CB1 et CB2. Les autres constituants du système endocannabinoïde sont les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation des ligands (d'après Sanchéz *et al* [114])

Le système endocannabinoïde est surtout présent dans le système nerveux et le système immunitaire, mais toutes les cellules de l'organisme peuvent synthétiser ses ligands. Il a également un rôle dans certaines pathologies, et notamment dans le cancer, les désordres métaboliques et les addictions à certaines drogues. Dans le cancer, il peut soit être impliqué dans la progression ou la régression de la tumeur, soit avoir une action bénéfique sur les effets



secondaires dues aux traitements (radiothérapie et chimiothérapie), à savoir la nausée, la perte d'appétit, la douleur, etc...

Dans le système nerveux central, les endocannabinoïdes et leurs récepteurs modulent la signalisation neuronale et jouent un rôle clef dans la régulation des fonctions psychomotrices, l'émotion, l'appétit, la régulation de la température corporelle, la mémoire et la perception de la douleur [115-117]. En périphérie, les endocannabinoïdes sont impliqués dans le contrôle de la sécrétion neuroendocrinienne, la mobilité gastrique, les fonctions urinaire et le contrôle de la réponse immunitaire [115, 116, 118-121].

## 2.2. Les récepteurs endocannabinoïdes

### 2.2.1. Les récepteurs CB1 et CB2

#### 2.2.1.1. Structures et fonctions

Le récepteur CB1 est un membre de la classe des rhodopsine-like, une superfamille de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et, comme d'autres RCPG, CB1 est constitué d'un domaine extracellulaire amino-terminal glycosylé, un domaine à sept hélices  $\alpha$  transmembranaires et un domaine intracellulaire carboxy-terminal. Il peut être exprimé à la surface de la cellule, où il est enchâssé dans la membrane plasmique, ou à l'intérieur de la cellule, au niveau des membranes des endosomes et/ou des lysosomes [122]. La partie carboxy-terminale est impliquée dans la liaison à une protéine G inhibitrice (prot  $G_{i/o}$ ), la désensibilisation et le trafic intracellulaire du récepteur.

L'activation de CB1 peut induire la suppression de l'activité de l'adénylate cyclase, ce qui conduit à l'inhibition des voies de signalisation dépendantes de l'AMPc [123] mais aussi à l'activation de la phospholipase C [124], à l'activation des MAP Kinase et des protéines de la famille de NF- $\kappa$ B [125, 126] ainsi que la modulation des canaux ioniques [127]. L'effet psycho-actif des dérivés cannabinoïdes de la plante *Cannabis sativa* passe par CB1.

Comme CB1, CB2 est un RCPG couplé à une protéine  $G_{i/o}$  et inhibe l'adénylate cyclase. CB2 possède à peu près les mêmes fonctions que CB1. Il active la voie des MAP kinases et de NF- $\kappa$ B. Cependant, au contraire de CB1, CB2 ne module pas l'activité des canaux ioniques tels que les canaux calciques ou potassiques [123]. CB2 induit également la production de céramide conduisant à l'apoptose [128, 129].

#### 2.2.1.2. Localisation

CB1 est principalement exprimé dans le système nerveux central et périphérique [130]. Il fait parti des récepteurs les plus exprimés par les neurones dans le cerveau [131]. CB1 module l'inhibition de la libération continue d'un certain nombre de neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs. En effet, CB1 est présent au niveau pré-synaptique et inhibe la libération de l'acétylcholine, de la noradrénaline, de la dopamine, de la 5-hydroxytryptamine, du *D*-aspartate, de la cholécystokinine, du glutamate et de la glycine [132]. Des niveaux élevés d'expression de CB1 ont été rapportés dans le cortex, l'amygdale, les noyaux gris centraux, le cervelet et les centres émétiques du tronc cérébral [116, 133, 134]. La distribution de ces récepteurs dans le système nerveux central est telle que leur activation peut affecter les processus de la cognition, de la mémoire, modifier le contrôle des fonctions motrices et induire des signes d'analgésie.

CB1 peut également se retrouver dans le système immunitaire où il est cependant 10 à 100 fois moins exprimé que dans le système nerveux.

CB2 est principalement exprimé par les cellules du système immunitaire, et en particulier par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les lymphocytes B, les cellules NK et les monocytes/macrophages [135]. CB2 est, au contraire, très peu exprimé au niveau du système nerveux central. Les premières études n'ont pas trouvé trace de la protéine ni de l'ARNm dans le SNC [133]. Cependant, des études récentes ont montré la présence du récepteur dans les cellules microgliales activées. Dans un cerveau sain, en revanche, les cellules microgliales n'expriment pas CB2 [136]. Les cellules microgliales sont dérivées des macrophages et sont considérées comme les cellules immunitaires résidentes du cerveau.

Lorsqu'il est activé, CB2 peut moduler la migration des cellules du système immunitaire, et en particulier des cellules de l'immunité innée comme les macrophages et les cellules NK. Dans le cerveau, CB2 module la migration et l'infiltration de la microglie dans certaines aires cérébrales en proie à une neuro-inflammation ou en dégénérescence [137]. Son activation permet également de moduler la libération de cytokines [131, 132].

CB2 est aussi présent dans les cellules de l'endothélium pulmonaire [138], dans les os (ostéocytes, ostéoblastes et ostéoclastes) où il module l'homéostasie du tissu osseux [139]. CB2 est également exprimé dans le système gastro-intestinal [140-142] et, à un niveau élevé, dans les organes de reproduction.

### 2.2.1.3. Signalisation

Avant la découverte des récepteurs endocannabinoïdes, les mécanismes d'action des cannabinoïdes étaient généralement attribués à leurs propriétés de solubilité lipidique. Ainsi, le  $\Delta^9$ -THC augmente la fluidité membranaire des terminaisons synaptiques à des doses comprises entre 3  $\mu$ M et 10  $\mu$ M [143]. D'autre part, les propriétés des cannabinoïdes psychoactifs ou non capables d'influencer les activités ATPasiques et oxydatives des monoamines, des activités de liaison des hormones et des neurotransmetteurs et la recapture des neurotransmetteurs par les extrémités synaptiques, ont été attribuées pendant un temps (fin des années 80) à leur capacité à s'insérer dans les membranes cellulaires [144, 145]. L'avancée des recherches a suggéré que des récepteurs étaient certainement impliqués dans la modulation des effets des (endo)cannabinoïdes. L'action des endocannabinoïdes sur des cellules neuronales est inhibée lorsque les cellules sont prétraitées avec la toxine pertussique, inhibiteur des protéines G inhibitrices qui induit une augmentation de la production d'AMPc. Cette découverte a permis de faire le lien entre les endocannabinoïdes et une voie de signalisation impliquant des protéines Gi/o [146]. De plus, des concentrations submicromolaires de composés cannabinoïdes entraînent une diminution de l'accumulation d'AMPc dans des cultures de cellules neuronales et inhibent l'activité de l'adénylate cyclase [147-149]. Ces observations ont permis non seulement d'accélérer les recherches sur les récepteurs endocannabinoïdes mais également de mettre en évidence l'une des voies de signalisation principale du système endocannabinoïde : la voie de l'AMPc.

Les récepteurs CB1 et CB2 stimulent également la voie des MAP Kinase. Il a également été montré que les endocannabinoïdes induisent la voie de signalisation des MAPK médiée par le récepteur CB2 [129, 150, 151]. La stimulation des récepteurs endocannabinoïdes par les endocannabinoïdes entraîne une régulation complexe et une modulation de la voie de l'AMPc.

#### 2.2.1.3.1. Inhibition de la voie de l'AMP cyclique

Les récepteurs endocannabinoïdes peuvent moduler plusieurs voies de signalisation dont la voie de l'AMPc. Pour CB1, l'inhibition de la production d'AMP cyclique est caractéristique des agonistes (endo)cannabinoïdes dans le cerveau [152, 153]. La régulation des activités cellulaires par la protéine kinase A dépendante de l'AMPc est une voie de signalisation très importante dans les cellules neuronales utilisant le courant potassique de type A (courant transitoire). La stimulation de CB1 entraîne une diminution de l'AMPc intracellulaire, une

dépolarisation des canaux, une activation du courant potassique de type A et une hyperpolarisation de la membrane. La conséquence de la dépolarisation de l'extrémité des terminaisons axonales est une diminution de la sensibilité aux stimuli dépolarisants et une inhibition de l'exocytose des neurotransmetteurs dans l'espace synaptique [154-156].

Dans le système immunitaire aussi, la voie de l'AMPc joue un rôle important. La cascade de signalisation dépendante de l'AMPc à un rôle positif dans la régulation des fonctions cellulaires du système immunitaire, l'activation des récepteurs endocannabinoïdes pouvant alors empêcher l'activation de ces cellules

#### 2.2.1.3.2. Activation de la voie de l'AMP cyclique

Les récepteurs endocannabinoïdes peuvent également entraîner la production d'AMPc sous certaines conditions. Trois mécanismes peuvent expliquer l'activation de la production d'AMPc :

- La production de prostaglandine, composé intermédiaire, qui peut induire la production d'AMPc [157, 158]. La synthèse de prostaglandine est impliquée dans la production d'AMPc médiée par les cannabinoïdes [159].
- L'activation des récepteurs cannabinoïdes de manière dépendante des isoformes de l'adénylate cyclase et de la manière dont ces isoformes vont répondre aux protéines G i/o associées aux récepteurs [160].
- Une interaction directe entre les récepteurs et des protéines G stimulatrices.

#### 2.2.2. TRPV1

Le récepteur vanilloïdien de type 1 (TRPV1, Vanilloïd receptor 1) est un intégrateur polymodal des stimuli de la douleur [161, 162]. C'est un canal cationique non spécifique avec néanmoins une certaine sélectivité pour les ions  $Ca^{2+}$ . Il est surtout exprimé par les neurones sensitifs [162]. Il joue un rôle dans la modulation de différentes formes de douleurs.

TRPV1 est présent sur les neurones et les astrocytes du SNC [163-165], les cellules musculaires lisses [166] et l'urothélium [167]. Au niveau des muscles lisses, TRPV1 module la vasoconstriction. Au niveau de l'urothélium, des recherches en cours suggèrent une modulation de l'activité de la fonction urinaire [168].

Etant donné la structure lipidique des endocannabinoïdes, il a été proposé que certains ligands endocannabinoïdes pourraient être des ligands de TRPV1. En effet, l'anandamide peut se lier à TRPV1. En revanche, le 2-AG ne semble pas avoir d'activité *via* TRPV1.

### 2.2.3. GPR55

Le récepteur GPR55 est un récepteur couplé à une protéine G et a récemment été proposé comme pouvant lier les endocannabinoïdes. Mais sa classification parmi les récepteurs cannabinoïdes est controversée [169]. Le lysophosphatidylinositol (LPI) est capable de se lier et d'activer GPR55, et ainsi d'induire une cascade de signalisation entraînant une augmentation du calcium intracellulaire et une augmentation d'expression de la phospholipase C (PLC) [170, 171].

## 2.3. Les principaux ligands endocannabinoïdes

### 2.3.1. L'anandamide

#### 2.3.1.1. Biosynthèse

Le métabolisme de l'AEA fait intervenir plusieurs voies de synthèse et de dégradation. La voie de synthèse principale fait intervenir la *N*-acyltransférase (NAT), qui va permettre le transfert de l'acide arachidonique positionné à la position *sn*-1 du composé *sn*-di-arachidonoyl-phosphatidylcholine (PC) sur une phosphatidyléthanolamine (PE), ce qui va générer le *N*-arachidonoylphosphatidyléthanolamine (NArPE). NArPE est ensuite clivé par la phospholipase D spécifique du *N*-acyl-phosphatidyléthanolamine (NAPE-PLD) qui donne naissance à deux composés, l'arachidonylethanolamide (ou anandamide ou AEA) et un acide phosphatidique. Le NArPE peut également être clivé par d'autres enzymes (Figure 7) :

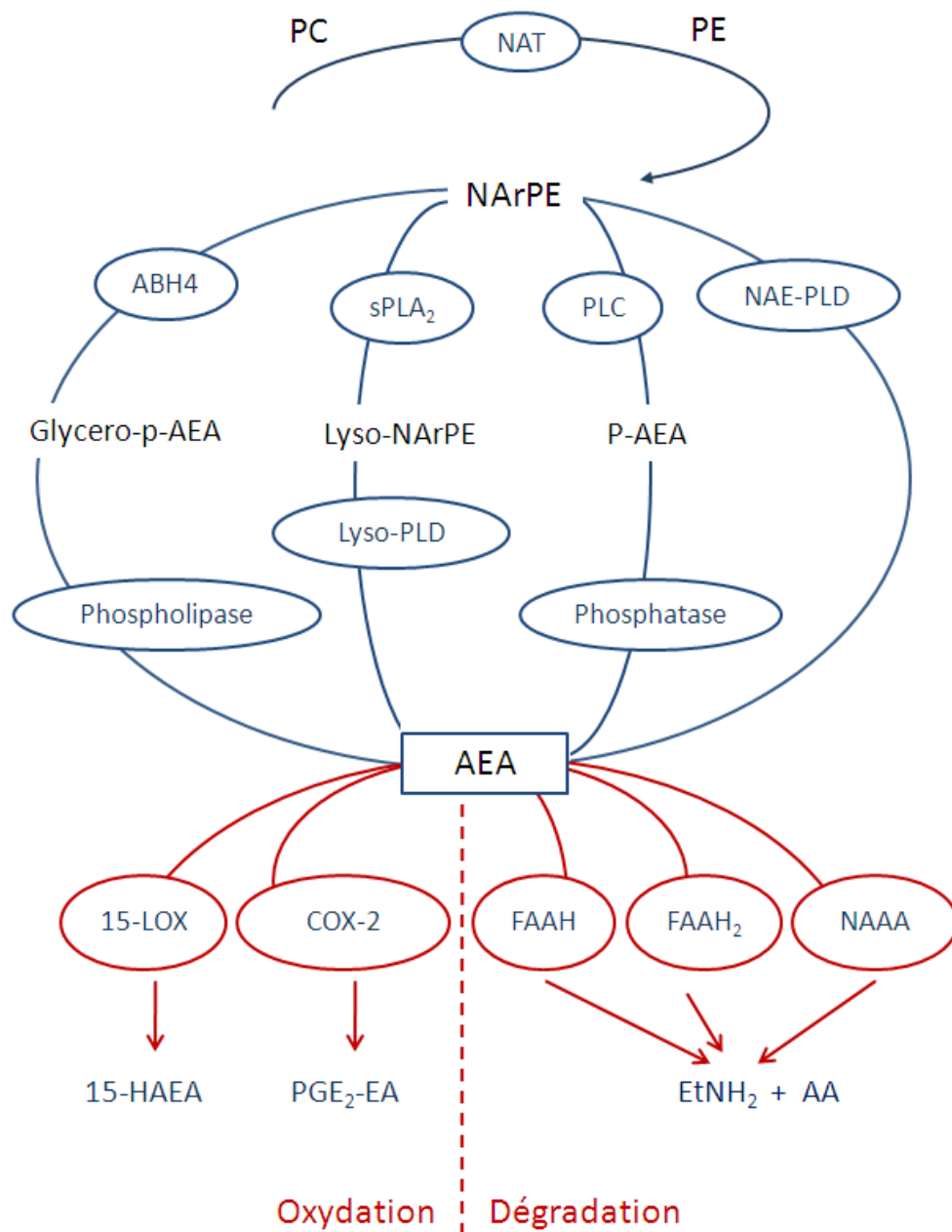
- La phospholipase C (PLC) clive le NArPE et génère un phospho-AEA (p-AEA) qui sera ensuite déphosphorylé par une phosphatase.
- La phospholipase A<sub>2</sub> sécrétée (sPLA<sub>2</sub>) peut hydrolyser le NArPE en *N*-arachidonoyl-*lyso*-phosphatidylethanolamine (*lyso*-NArPE), qui est ensuite hydrolysé en AEA par la *lyso*-phospholipase D (*lyso*-PLD).

- Enfin, le NArPE peut être déacétylé par une *lyso*-phospholipase/phospholipase B, ABH4 ( $\alpha/\beta$ -hydrolase), qui va générer le glycéro-phospho-AEA (glycéro-p-AEA) qui est ensuite clivé par une phospholipase pour donner l'AEA[172].

#### 2.3.1.2. Dégradation

La voie principale de dégradation de l'AEA est l'hydrolyse de l'acide arachidonique (AA) et de l'éthanolamine (EtNH<sub>2</sub>). Cette réaction est catalysée par l'enzyme fatty-acid-amine-hydrolase-1 (FAAH-1). Une isoforme de la FAAH, FAAH-2, peut également hydrolyser l'AEA ainsi que la N-acyléthanolamine-hydrolysing acid amidase (NAAA). Des voies de dégradation secondaire peuvent également anaboliser l'AEA (Figure 7).

- L'AEA peut être dégradé par oxydation : 15-lipoxygénase (15-LOX) induit l'oxydation de l'AEA en 15-hydroxy-AEA (15-HAEA).
- L'AEA peut également être oxydé en prostaglandin E<sub>2</sub>-éthanolamide (PGE<sub>2</sub>-EA) par l'action de cyclooxygénase-2 (COX-2) [172].



**Figure 8 :** Biosynthèse (parcours bleu) et dégradation (parcours rouge) de l'AEA. Représentation schématique des enzymes (entourées d'un cercle bleu ou rouge) et des composés intermédiaires, impliqués dans la transformation chimique des phospholipides (PC,PE) en AEA et dans l'oxydation de l'AEA en 15-HAEA et PGE<sub>2</sub>-EA et dans sa dégradation en EtNH<sub>2</sub>+AA.

### 2.3.2. Le 2-arachidonoylglycérol

#### 2.3.2.1. Biosynthèse

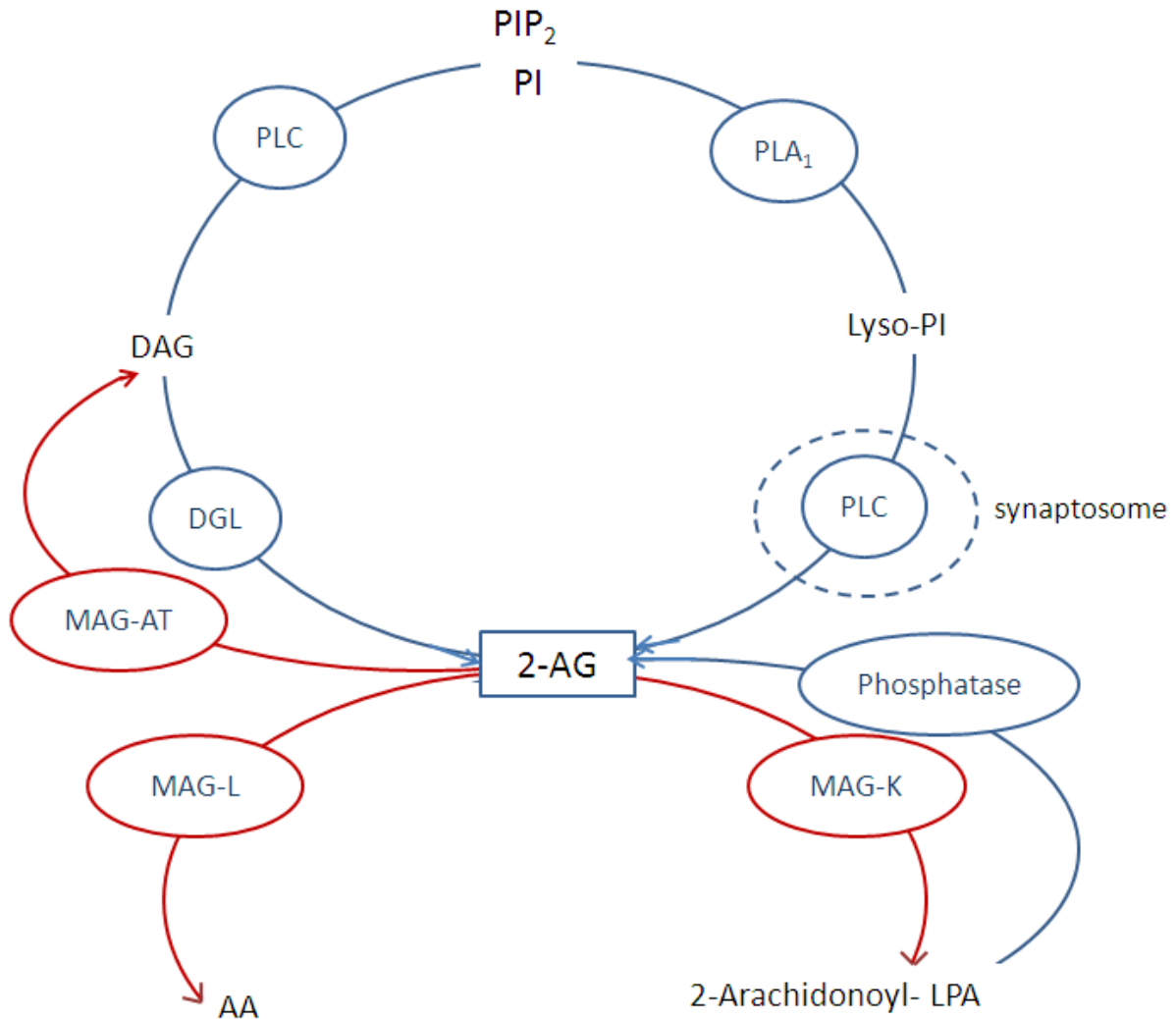
Le 2-AG peut être rapidement synthétisé à partir des phospholipides membranaires riches en acides arachidoniques comme le phosphatidylinositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>) ou le phosphatidylinositol (PI), par l'action de la phospholipase C. le 2-AG peut également être formé à partir de l'acide arachidonique contenu dans les lysophospholipides sous l'action d'une phosphatase [173]. La première voie de synthèse du 2-AG implique une hydrolyse rapide du phosphatidylinositol par une phospholipase C ce qui va générer le diacylglycerol (DAG). Ce DAG sera ensuite hydrolysé par une diacylglycérol lipase (DGL) [174]. Cette voie de synthèse du 2-AG est utilisée dans de nombreux tissus et cellules sous l'action de différents stimuli comme le Ca<sup>2+</sup> [175]. La deuxième voie de synthèse du 2-AG entraîne l'hydrolyse du PI par une phospholipase A<sub>1</sub> produisant un lysophosphatidylinositol (lyso-PI) qui sera à son tour hydrolysé par une phospholipase C spécifique [176-178]. La phospholipase C spécifique du lysophosphatidylinositol diffère de la phospholipase C qui hydrolyse le PI dans la première voie de synthèse par son emplacement. En effet, elle est localisée dans les synaptosome [177, 178].

D'autres voies de synthèse secondaire du 2-AG existent également, comme la conversion du 2-arachidonoyl LPA ou du 2-arachidonoyl PA en 2-AG par une phosphatase (Figure 8).

#### 2.3.2.2. Dégradation

L'excès de 2-AG pouvant entraîner des effets délétères, sa clairance doit donc être rapide. Une voie de dégradation du 2-AG est son hydrolyse par une monoacylglycérol lipase (MAG-L). Le 2-AG peut également être transformé en 2-arachidonoyl LPA sous l'action d'une monoacylglycérol kinase (MAG-K). Le 2-arachidonoyl LPA ainsi obtenu pourra, à nouveau, donner un PI. Une autre voie de dégradation importante pour recycler le 2-AG est une acétylation du 2-AG en DAG par une monoacylglycérol acyltransférase (MAG-AT). Une autre voie est l'hydrolyse du 2-AG en acide arachidonique (AA) par une monoacylglycerol lipase ou par l'anandamide amidohydrolase (Figure 8).





**Figure 9 :** Biosynthèse (parcours bleu) et dégradation (parcours rouge) du 2-AG. Représentation schématique des enzymes (entourées d'un cercle bleu ou rouge) et des composés intermédiaires, impliqués dans la transformation chimique du phosphatidyl inositol (PI) biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en 2-AG et dans la dégradation du 2-AG ainsi obtenue en 2-Arachidonoyl-LPA, AA et diacylglycérol (DAG).

### 3. Rôle du système endocannabinoïde dans le système nerveux central (SNC)

#### 3.1. La plasticité synaptique

Dans le SNC, la transmission synaptique est un des principaux moyens qu'ont les neurones de communiquer entre eux. Globalement, la transmission synaptique dans le SNC correspond à

l'échange d'informations entre une terminaison pré-synaptique et une terminaison post-synaptique. Cet échange se fait par le biais de messagers chimiques appelés neurotransmetteurs. Les synapses sont soumises à de nombreuses modifications en fonction du message qu'elles véhiculent et des facteurs moléculaires qui régulent la transmission. Ces modifications traduisent une plasticité des connections synaptiques.

Le système endocannabinoïde joue un rôle important dans la plasticité synaptique. Les endocannabinoïdes sont principalement produits par la partie post-synaptique et vont se fixer sur le récepteur CB1 exprimé par la terminaison pré-synaptique. Cette action des endocannabinoïdes va inhiber de manière transitoire ou à plus long terme la libération d'autres neurotransmetteurs dans l'espace synaptique par l'extrémité pré-synaptique (les endocannabinoïdes ont une fonction de messenger rétrograde) [179]. Il existe différents endocannabinoïdes qui agissent sur la plasticité synaptique et chacun d'entre eux n'agit que sur certaines synapses et requiert un type d'induction spécifique. La suppression synaptique induite par les endocannabinoïdes est unique et a été rapportée sur les synapses inhibitrices et activatrices dans différentes structures du cerveau.

### 3.1.1. Les endocannabinoïdes, médiateurs de la plasticité synaptique (dépression) à court terme

La plasticité synaptique à court terme se caractérise par un phénomène transitoire (une minute ou moins). Elle fait intervenir une dépolarisation qui vise à supprimer, soit un message d'inhibition (depolarization-induced suppression of inhibition, DSI) qui se traduit par la diminution de la libération du neurotransmetteur GABA par l'extrémité pré-synaptique [179, 180], soit un message d'excitation (depolarization-induced suppression of excitation, DES), qui se traduit par la diminution de l'exocytose du neurotransmetteur glutamate par l'extrémité pré-synaptique [181]. Il a été observé que certains agonistes du récepteur CB1 (principalement exprimé par l'extrémité pré-synaptique) induisent la DES/DSI et que, à l'inverse certains antagonistes de CB1 inhibent la DSI/DES. Ainsi, l'AEA et le 2-AG peuvent entraîner une DSI [179, 181, 182].

### 3.1.2. Les endocannabinoïdes, médiateurs de la plasticité synaptique (dépression) à long terme

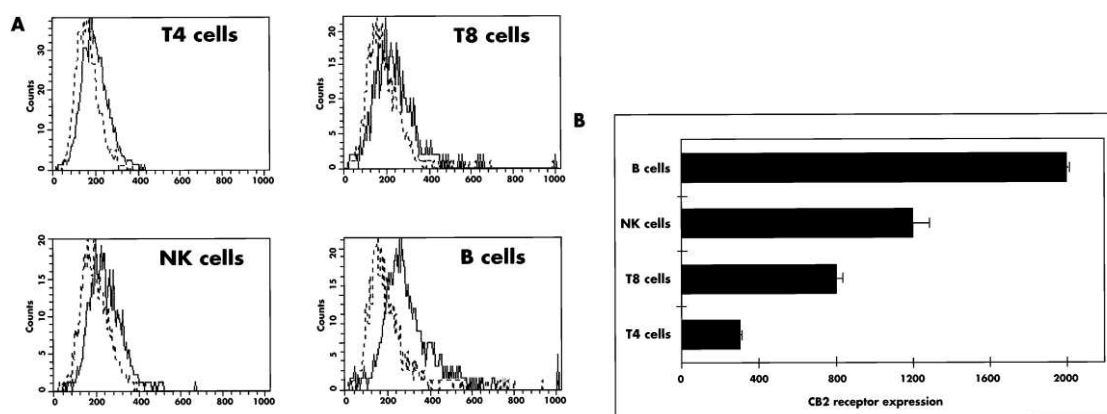
Les endocannabinoïdes sont également impliqués dans des formes plus persistantes dans le temps de plasticité synaptique (de quelques heures à quelques semaines). Ce phénomène à long terme est surtout impliqué dans l'apprentissage et la mémoire. La sécrétion des endocannabinoïdes par l'extrémité post-synaptique va activer le récepteur CB1 de l'extrémité pré-synaptique et induire une diminution sur le long terme de la libération des neurotransmetteurs [183]. La « dépression » à long terme médiée par les endocannabinoïdes (eC-LTD) est un phénomène généralisé dans le cerveau. Il a été reporté dans différentes structures du cerveau, tels que le striatum dorsal, le nucleus accumbens [184], l'hippocampe [185], le cortex visuel [186], le cortex somatosensoriel [187], le cortex préfrontal [188], l'aire ventrale tegmenta [189], et le colliculus supérieur [190]. Ce phénomène peut être observé à la fois sur les synapses inhibitrices et sur les synapses activatrices. Cette prévalence suggère que le eC-LD est un mécanisme fondamental pour modifier, sur le long terme, les circuits neuronaux et le comportement.

## **4. Rôle du système endocannabinoïde dans le système immunitaire**

Les premières études réalisées sur l'effet (modulation) des cannabinoïdes sur le système immunitaire datent des années 70. A cette époque, l'usage de cannabis est associé à une augmentation de l'incidence des infections virales et des symptômes allergiques. Des études ultérieures ont clarifié les effets des (endo)cannabinoïdes *in vitro* et *in vivo*, sur différents modèles cellulaires, humain et animal.

### 4.1. Récepteurs endocannabinoïdes et système immunitaire

Les endocannabinoïdes participent à l'homéostasie immunitaire. Les récepteurs CB1 et CB2 sont tous les deux exprimés par les cellules immunitaires, bien que CB1 le soit à des niveaux faibles. En revanche, CB2 est fortement exprimé (10 à 100 fois plus que CB1) par les cellules du système immunitaire. Le niveau d'expression de CB2 varie en fonction du type cellulaire (de l'expression la plus forte de CB2 à l'expression la plus faible : cellules B > cellules NK > monocytes > neutrophiles > lymphocytes T CD8 > Les lymphocytes T CD4) [133] (Figure 10).



**Figure 10** : Expression du récepteur CB2 par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, par les lymphocytes B et par les cellules NK.

**A**, Expression de CB2 en cytométrie en flux, représentatif de trois donneurs différents, l'expression de CB2 étant représentée par la ligne pleine et le contrôle négatifs par les pointillés. **B**, Représentation en histogramme des différences d'expression du récepteurs CB2 par les 4 types cellulaires analysés dans la figure A. (d'après Carayon *et al* [191])

#### 4.2. Modulation du système immunitaire par les endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes modulent la prolifération et l'apoptose des lymphocytes T et B, la production de cytokines pro-inflammatoires, l'activation des cellules immunitaires par des stimuli inflammatoires et la migration des cellules [118, 192]. Les cellules immunitaires ont également un rôle dans la régulation périphérique du système endocannabinoïde et dans l'homéostasie des endocannabinoïdes.

##### 4.2.1. Métabolisme des endocannabinoïdes par le système immunitaire

Plusieurs études ont mis en évidence que la biosynthèse et la dégradation des endocannabinoïdes peut se faire par les cellules du système immunitaire, et notamment dans les macrophages [193-195]. Les lignées cellulaires de basophiles (RBL-2H3) et de macrophages (J774) peuvent synthétiser l'AEA en hydrolysant le N-acylphosphatidyléthanolamide. Cette capacité de synthèse par les cellules immunitaires appuie l'idée d'un rôle modulateur des endocannabinoïdes dans les réactions immunitaires et inflammatoires.

Le LPS, composé microbien, entraîne une augmentation du taux d'AEA en inhibant l'expression de l'enzyme FAAH responsable de sa dégradation dans les lymphocytes

périphériques. Cet effet du LPS est similaire à celui observé en utilisant un inhibiteur de la FAAH [196, 197]. Une autre étude a également montré que le LPS augmente la synthèse *in vitro* de 2-AG par les macrophages de rat. [198].

#### 4.2.2. Propriétés immunosuppressives des endocannabinoïdes

De nombreuses études ont rapporté que le système endocannabinoïde a comme principal effet, une action immunosuppressive sur le système immunitaire. L'activation de CB2 entraînant une inhibition de la voie de signalisation de l'AMPc et de la protéine kinase A (PKA), elle induit, par voie de conséquence, une diminution de l'expression des gènes répondant à l'AMPc. Le rôle inhibiteur des endocannabinoïdes sur la formation de l'AMPc est important pour la régulation de l'activité inflammatoire des lymphocytes [107, 199].

A fortes doses (10-100  $\mu\text{M}$ ), l'AEA affecte la prolifération cellulaire des lymphocytes très rapidement après exposition. 4 h de culture sont suffisantes pour atteindre 40 % d'inhibition de la prolifération [200]. Au niveau du cycle cellulaire, les endocannabinoïdes activent la protéine p21 waf-1/cip-1 et induisent l'arrêt du cycle en phase G1/S [201]. L'effet immunosuppresseur des endocannabinoïdes est également associé à une induction de la mort cellulaire par apoptose. Les endocannabinoïdes agissent au niveau du noyau de la cellule en induisant par exemple la phosphorylation de, I $\kappa$ -B- $\alpha$  ce qui va entraîner la transcription de plusieurs gènes pro-apoptotiques régulés par NF- $\kappa$ B mais également par PPAR $\gamma$  [202].

A noter que les effets des endocannabinoïdes sur les fonctions immunitaires sont transitoires, ce qui permet une disparition des effets inhibiteurs quand le système immunitaire doit être activé pour combattre une infection par exemple.

#### 4.2.3. Propriétés pro-inflammatoires des endocannabinoïdes

Malgré le fait que la majorité des publications qui traitent des rôles du système endocannabinoïde dans l'immunité le décrivent comme principalement immunosuppresseur et anti-inflammatoire, plusieurs articles récents suggèrent un rôle pro-inflammatoire. En effet, à des doses physiologiques (de l'ordre du nano molaire), certains endocannabinoïdes et dérivés cannabinoïdes stimulent la production d'IL-12 et entraînent une diminution de la sécrétion d'IL-10, et ce *in vitro* et *in vivo* [203-205]. Par exemple, le cannabidiol (dérivé cannabinoïde), utilisé à de faibles doses ( $5 \times 10^{-9}$  –  $5 \times 10^{-7}$  M) augmente significativement la production d'IL-12

par des macrophages stimulés avec du LPS plus IFN $\gamma$ . Lorsque les doses de cannabidiol augmentent ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ), l'effet disparaît et la production d'IL-12 redevient comparable au contrôle LPS+IFN $\gamma$  seul. Un autre exemple est l'augmentation de la production d'IFN $\gamma$  et de la prolifération des splénocytes dans un modèle de co-culture de cellules présentatrices d'antigènes plus splénocytes. L'AEA augmente également l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 ainsi que la production d'IL12. Cet effet est observé quand l'AEA est utilisé à des concentrations de l'ordre du nano molaire et disparaît quand les concentrations augmentent [206].

#### 4.3. Effets des endocannabinoïdes sur les différents types cellulaires du système immunitaire

##### 4.3.1. Les lymphocytes et les cellules hématopoïétiques

L'AEA a un effet immunosuppresseur dépendant de la dose sur la prolifération des lymphocytes T et B. Les cellules B ont le niveau le plus élevé d'expression du récepteur CB2 parmi les cellules immunitaires. Les endocannabinoïdes sont impliqués dans la migration des cellules B et dans la production de certaines cytokines [207]. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les endocannabinoïdes inhibent la production d'anticorps par les cellules B à des doses de l'ordre du micromolaire [208]. Une stimulation *via* CB2 induit une différenciation des cellules B [191]. Cependant, il reste encore à déterminer si les endocannabinoïdes ont un effet direct sur les cellules B ou si leur effet passe par les cellules T et les macrophages pour activer les cellules B. En effet, la modulation du niveau sérique des immunoglobulines est surtout due à un effet sur la sécrétion et la polarisation des lymphocytes Th par les endocannabinoïdes plutôt qu'à un effet direct de ces derniers sur les cellules B.

Les endocannabinoïdes ont un effet sur l'inhibition ou l'induction de cytokines par les lymphocytes T de type Th1 ou Th2. L'AEA a été testés sur des PBMC stimulés avec du LPS *in vitro* et sur un modèle murin d'inflammation pulmonaire induite par du LPS. Les résultats montrent une diminution de la synthèse des cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8) induite par le LPS en réponse aux endocannabinoïdes utilisés à des doses de l'ordre du micromolaire [209].

L'AEA (0.1 et 10  $\mu\text{M}$ ) stimule la prolifération des lignées de cellules hématopoïétiques quand il est utilisé en synergie avec d'autres facteurs de croissance, tels que le GM-CSF, le G-CSF ou l'IL-3 [210]. Cependant, cet effet n'est pas inhibé par l'utilisation d'antagonistes des

récepteurs CB1 et CB2, suggérant un effet indépendant de ces récepteurs. En revanche, l'AEA seule n'a aucun effet sur la prolifération de ces lignées. D'autre part, les endocannabinoïdes ont un effet chimio attractant pour les cellules hématopoïétiques [211].

#### 4.3.2. Les macrophages

Les macrophages jouent un rôle important à la fois dans l'immunité innée et dans l'immunité adaptative. Ce sont des CPA ; leurs fonctions principales sont de phagocyter et de présenter des antigènes aux lymphocytes T. Ils sécrètent aussi de nombreuses cytokines, telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF $\alpha$ . Les récepteurs cannabinoïdes sont fortement exprimés par ces cellules ainsi que par les cellules microgliales, CPA du système nerveux central (SNC). L'AEA empêche la mort des fibroblastes L929, sensibles au TNF $\alpha$  produit par les macrophages [212]. Les endocannabinoïdes inhibent également l'expression de molécules pro-inflammatoires induites par la lignée murine macrophagique RAW264.7, et induites par le LPS [213].

#### 4.3.3. Les mastocytes

Les mastocytes, localisés dans les muqueuses et dans le système nerveux, sont impliqués dans les réactions inflammatoires. L'utilisation de lignées cellulaires de mastocytes a permis de montrer que l'AEA et le PEA peuvent se lier au récepteur CB2 mais que seul le PEA diminue l'activation de ces cellules. Cet effet du PEA est inhibé par l'AEA [214]. Hormis le PEA, les endocannabinoïdes induisent de façon dépendante de la dose, la sécrétion d'histamine par les mastocytes péritonéaux de rat [215]. Cet effet est partiellement diminué avec la toxine pertussique, ce qui indique un rôle des protéines Gi dans la sécrétion d'histamine. Des ligands synthétiques endocannabinoïdes potentialisent la sécrétion d'histamine induite par des anticorps anti-IgE. Les ligands naturels, en revanche, ne potentialisent pas la production d'histamine induite par les anticorps anti-IgE.

#### 4.3.4. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont les CPA majeures du système immunitaire et ont un rôle important dans l'initiation et la polarisation des réponses immunes spécifiques d'Ag. Les DC expriment les récepteurs CB1 et CB2. Le système endocannabinoïde joue un rôle important

dans la régulation de la croissance et de la maturation des DC [216]. Le système endocannabinoïde présent dans les DC est modulé en fonction de leur état d'activation [217]. Après activation au LPS, la quantité de 2-AG est augmentée dans les DC ; cependant cela ne s'accompagne pas d'une augmentation d'expression des récepteurs CB1 et CB2 ou de la FAAH. Le 2-AG peut agir comme une molécule chimiotactique pour les DC pendant la réponse immunitaire innée [216]. Les cellules dendritiques sont très sensibles à l'apoptose induite par les cannabinoïdes L'apoptose est induite à la fois par les composés cannabinoïdes exogènes et les composés endocannabinoïdes endogènes, lorsque les concentrations de ces composés dépassent le micromolaire (5-20  $\mu\text{M}$ ) [218]. Des concentrations plus faibles (inférieure à 1  $\mu\text{M}$ ) n'ont pas d'effet sur l'induction d'apoptose des cellules dendritiques.

#### 4.3.5. Les cellules NK et les neutrophiles

Les cellules NK et les neutrophiles sont des cellules de l'immunité innée et sont impliqués dans la défense contre les cancers et les agressions microbiennes. Des études *in vitro* ont montré qu'à fortes concentrations (supérieures à 10  $\mu\text{M}$ ), les endocannabinoïdes inhibent l'expression constitutive des chimiokines IL-8, MIP-1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , RANTES, GM-SCF et IFN $\gamma$ . Des études ont montré que les (endo)cannabinoïdes inhibent les principales fonctions des cellules NK, à savoir leurs activités cytotoxiques et sécrétrices, à la fois chez l'homme, le rat et la souris [219-221]. Cependant, toutes ces études ont été réalisées à la fin des années 1980 en utilisant des doses fortes d'endocannabinoïdes (minimum 10  $\mu\text{M}$ ). Il a également été montré que certains endocannabinoïdes (comme le 2-AG) induisent la migration des cellules NK [222].

## 5. Rôle du système endocannabinoïde dans le cancer

Le cancer survient lorsqu'une cellule voit son ADN muter. Toutes les mutations n'aboutissent pas au développement d'un cancer mais un cancer a toujours pour origine une ou plusieurs mutations entraînant un dérèglement des voies de signalisation régulant l'homéostasie cellulaire, la survie et/ou la mort cellulaire. Un cancer n'est pas constitué d'un seul type de cellule mutante. Au contraire, une masse cancéreuse regroupe plusieurs types cellulaires différents comme des fibroblastes, des cellules épithéliales, des cellules immunes, des cellules endothéliales ainsi que des cellules mésenchymateuses. L'homéostasie tissulaire est



maintenue par les interactions entre ces différents types cellulaires. Le développement cancéreux est favorisé quand une cellule mutante utilise ces interactions cellulaires pour sa propre survie [223].

### 5.1. Rôle du système endocannabinoïde dans la biologie des tumeurs

Le système endocannabinoïde est impliqué dans la biologie de certaines tumeurs. La quantification de l'expression des différents constituants du système endocannabinoïde à montré que, dans certains cancers les ligands AEA et 2-AG et quelques autres, sont sur- ou sous- exprimés. De même, certaines cellules tumorales présentent une augmentation ou une diminution de l'expression des récepteurs CB1 et CB2. A partir de ce constat, la question s'est posée de savoir quel pouvait être le rôle du système endocannabinoïde dans la surveillance et l'évolution tumorale.

#### 5.1.1. Expression des endocannabinoïdes dans le cancer

Le niveau d'expression des endocannabinoïdes est finement régulé et varie selon les conditions physiologiques et pathologiques. De fortes concentrations d'AEA sont retrouvées dans le placenta, la veine ombilicale et le plasma des femmes enceintes [224]. Des niveaux élevés d'endocannabinoïdes ont été rapportés dans certaines tumeurs, en comparaison aux tissus sains adjacents, par exemple dans les glioblastomes, les méningiomes [225], l'adénome pituitaire [226], le cancer de la prostate [227], le carcinome du colon et le sarcome endométrial [228-230]. L'AEA et le 2AG sont tous les deux augmentés dans le cancer colorectal aux stades polypes adénomateux et carcinomes [228]. Le niveau d'AEA est augmenté dans le glioblastome et le 2-AG dans le méningiome, en comparaison avec le tissu sain. A noter que les niveaux d'endocannabinoïdes varient en fonction du grade de la tumeur (Tableau 3).

#### 5.1.2. Les récepteurs endocannabinoïdes dans le cancer

Il n'y pas que l'expression des ligands AEA et 2-AG qui varie selon les cancers. Les récepteurs aussi voient leur régulation modifiée. Ces récepteurs jouent un rôle important dans les mécanismes anti-tumoraux des endocannabinoïdes. Il semble que les niveaux d'expression des récepteurs varient d'un tissu sain à un tissu tumoral. Cette différence pourrait expliquer la

protection des cellules saines vis-à-vis des effets pro-apoptotiques et anti-prolifératifs des agonistes cannabinoïdes [231]. Il a été reporté une augmentation de l'expression des récepteurs CB1 et CB2 dans la leucémie myéloïde aigüe [232], le carcinome hépatocellulaire [233], des lignées de cancer de la prostate [234], des astrocytomes [235], et le cancer pancréatique [236]. Aujourd'hui, la régulation des récepteurs endocannabinoïdes dans la progression tumorale n'est pas clairement établie (Tableau 3).

**Tableau 3** : Modulation de l'expression des récepteurs et des ligands endocannabinoïdes dans différents cancers.

Niveau d'expression des récepteurs	Type de tumeur	Niveau d'expression des endocannabinoïdes
↑ <b>CB1 and CB2</b>	-Lymphome du manteau	↑ AEA
	-Leucémie méloïde aigüe	↑ AEA
	-Carcinome hépatocellulaire bien différencié	↑ AEA
	-Carcinome de la prostate	↑ 2-AG ↓ AEA
	-Astrocytome malin	↑ AEA
	-Carcinome pancréatique	= AEA et 2-AG
↓ <b>CB1 et CB2</b>	-Carcinome hépatocellulaire peu différencié	↑ AEA
<b>pas de modulation de CB1 et CB2</b>	-Sarcome de kaposi	
	-Cancer de la peau non-mélanome	
	-Carcinome astroglial	↑ AEA
↑ <b>CB2</b>	-Adénome pituitaire	↑ AEA et 2-AG
	-Glioblastome	↑ AEA
	-Méningiome	↑ 2-AG
	-Carcinome primaire du poumon -estrogène récepteur négatif	↑ AEA
	-Carcinome endométrial	↑ 2-AG
	-Carcinome du colon	↑ AEA et 2-AG
↑ <b>CB1</b>	-Rhabdomyosarcome	
	-Gastrocarcinome	↓ AEA
↓ <b>CB1</b>	-Carcinome primaire du poumon	↑ AEA
↑ <b>TRPV1</b>	-Carcinome de la prostate	↑ 2-AG ↓ AEA
	-Carcinome de la langue	

### 5.1.3. Les fonctions anti-tumorales du système endocannabinoïde

L'activation des récepteurs endocannabinoïdes à la surface des cellules tumorales va activer des voies de signalisations impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire. Les différentes étapes de signalisations restent à être découvertes, mais elles impliquent au moins quatre mécanismes, une action anti-proliférative *via* la suppression du signal mitogénique, l'induction de l'apoptose, l'inhibition de l'invasion tumorale et de la néoangiogénèse.

#### 5.1.3.1. Effet anti-prolifératif

Des études menées par Di Marzo et ses collègues sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses de poumon ont montré que l'AEA et le 2-AG, à des doses de l'ordre du micromolaire, ont un effet anti-prolifératif (dépendant de la dose et du temps). Cet effet inhibiteur est plus dû à un arrêt du cycle en phase S qu'à l'induction de la mort cellulaire. Cette action des endocannabinoïdes se fait par l'activation de la voie de signalisation Raf-1 / MAP kinase et l'inhibition de l'adénylate-cyclase, ce qui va altérer le déroulement normal de la division cellulaire. Au moins deux facteurs de transcription indispensables à l'activité mitogénique des lignées pulmonaires sont touchés. Il s'agit du NGF et de la prolactine. En effet, l'AEA et le 2-AG vont déréguler l'expression de leurs récepteurs respectifs et inhiber ainsi leurs actions. D'autres types de cancers sont la cible des effets anti-prolifératifs des endocannabinoïdes comme le cancer colorectal. De fortes concentrations d'AEA (20-50  $\mu\text{M}$ ) inhibent la prolifération tumorale des quelques lignées testées dont la lignée DLD-1 [228].

#### 5.1.3.2. Induction de l'apoptose

L'apoptose induite par les cannabinoïdes peut être dépendante ou non de la voie de signalisation des caspases. De plus, les effets pro-apoptotiques induits par les cannabinoïdes peuvent également résulter d'une accumulation de céramide dans les cellules tumorales [237]. Il a été montré que, dans le cancer colorectal, l'activation de CB1 induit l'apoptose des cellules tumorales *via* l'inhibition de la voie de signalisation RAS-MAPK et PI3K-AKT, la diminution des facteurs anti-apoptotiques et l'accumulation de céramide [238]. L'activation des récepteurs CB1 et CB2 entraîne la synthèse *de novo* de céramide dans plusieurs types de tumeurs dont les gliomes, les cellules pancréatiques malignes et les leucémies. L'AEA peut induire des effets pro-apoptotiques dans le cholangiocarcinome *via* la stabilisation des radeaux lipidiques dans la membrane plasmique, mais aussi entraîner l'augmentation de céramide et le recrutement de complexes de mort cellulaire dans les radeaux lipidiques *via* la voie de signalisation Wnt [239].

#### 5.1.3.3. Inhibition de l'invasion tumorale

Durant leur évolution, certains cancers acquièrent la capacité d'échapper à la tumeur primaire et de former des métastases. Cette évolution métastatique est de très mauvais pronostique

pour la survie des patients. Plusieurs études ont montré un rôle des (endo)cannabinoïdes dans la migration cellulaire, l'invasion tissulaire et les métastases. Récemment, il a été rapporté que le cannabidiol, un dérivé de la plante aux propriétés non psychoactives, inhibe la croissance tumorale mais aussi la migration des cellules U87 (gliome humain) de manière dépendante de la dose [240]. D'autre part, l'accumulation de 2-AG, consécutive au blocage de son métabolisme, entraîne une inhibition significative de l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques PC-3 et DU-145 dépendantes des androgènes. WIN55.212-2 (ligand endocannabinoïde synthétique) est également capable d'inhiber, de manière dépendante de la dose, l'invasion des ces cellules. Cette inhibition passe par le récepteur CB1 [227, 241]. L'AEA exerce également des effets anti-prolifératifs et cytotoxiques sur la progression métastatique des cellules cancéreuses de la prostate [242]. L'AEA inhibe également la migration des cellules SW480 de carcinome colique *via* CB1 et des cellules T CD8 *via* CB2, suggérant que l'inhibition de la migration peut être ciblée *via* CB1 sans affecter la migration de certaines cellules du système immunitaire [232].

#### 5.1.3.4. Inhibition de l'angiogénèse

L'une des spécificités des cellules cancéreuses est leur capacité à proliférer malgré l'absence d'un signal mitogénique. Mais une tumeur ne peut croître sans l'apport d'éléments essentiels à son développement comme l'oxygène, et les métabolites et molécules nécessaires à ses divisions mitotiques. Pour cela, la tumeur doit mettre en place son propre réseau vasculaire à partir des vaisseaux préexistants. A partir de là, le ciblage de la néo-angiogénèse constitue l'un des moyens de lutte contre le cancer.

Il a déjà été montré que les cannabinoïdes permettent l'inhibition de la néo-angiogénèse tumorale dans plusieurs modèles de gliome murin [243]. La production de VEGF, facteur de croissance des cellules endothéliales, est inhibée dans les lignées tumorales de gliomes et dans des cellules issues de gliome de patient (glioblastome multiforme) après un traitement avec des agonistes des récepteurs CB1 et CB2, dont l'AEA. De plus, cette inhibition est levée après utilisation des antagonistes de CB1 et CB2, ce qui montre un rôle des récepteurs endocannabinoïdes dans l'inhibition de la production du VEGF [244].

#### 5.1.4. Les fonctions pro-tumorales des endocannabinoïdes

Malgré l'importance de la littérature en faveur d'une activité anti-cancéreuse des endocannabinoïdes, il est important de noter que le système endocannabinoïde peut, dans certains cas, être un facteur aggravant dans le processus tumoral. Il a été montré que des doses faibles d'analogues cannabinoïdes (submicromolaires) entraînent la prolifération de différentes lignées tumorales. En revanche, lorsque les doses utilisées dépassent le micromolaire, les cannabinoïdes induisent l'apoptose de ces mêmes lignées [245].

##### 5.1.4.1. Inhibition de l'immunité anti-tumorale

L'un des mécanismes de lutte contre le développement des cellules tumorales est le système immunitaire. Si de fortes doses d'endocannabinoïdes inhibent la croissance et la prolifération tumorale, elles entraînent également une nette diminution de l'efficacité du système immunitaire. Or, en fonction de leur profil d'expression des récepteurs CB1 et CB2, certains cancers sont résistants à l'action délétère des endocannabinoïdes.

Les propriétés immunosuppressives des agonistes (endo)cannabinoïdes *via* l'activation de CB2 augmente le risque de croissance tumorale suite à l'inhibition de la réponse immune anti-tumorale naturelle [246].

#### 5.2. Le système endocannabinoïde, une cible thérapeutique ?

Les cannabinoïdes sont déjà utilisés avec succès dans le traitement des effets secondaires liés aux chimiothérapies et aux radiothérapies, à savoir la nausée, la perte de poids, le manque d'appétit et la douleur. Le dronabilone® et le nabilone® sont utilisés pour traiter la nausée et les vomissements [247]. Bien que les cannabinoïdes soient utilisés comme traitement palliatifs dans certains cancers, leur indication thérapeutique ne concerne pas la progression tumorale en elle-même.

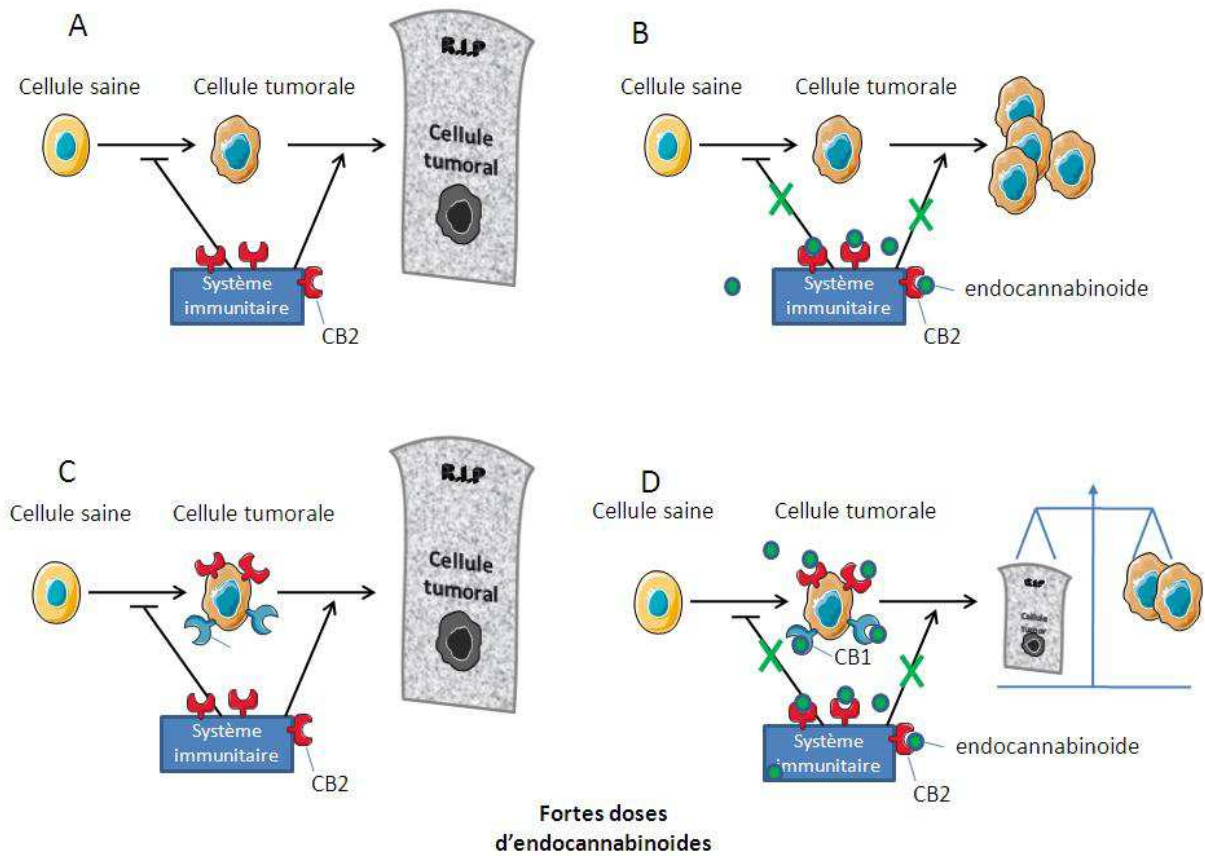
Les cannabinoïdes semblent bien tolérés par les animaux et ne produisent pas d'effets toxiques généralisés comme peuvent le faire les chimiothérapies. Cependant, les pressions sociales, politiques et légales mettent un frein aux applications thérapeutiques pour les agonistes spécifiques du récepteur CB1 qui induisent les effets psychotropes. Malgré que l'activation de ce récepteur dans le système nerveux central permette de traiter de manière bien connue au moins deux symptômes consécutifs des chimiothérapies, à savoir la nausée et

la perte d'appétit, son utilisation thérapeutique reste prohibée dans de nombreux pays, dont la France. Néanmoins, ces restrictions peuvent s'expliquer par le fait qu'un usage chronique de cannabis peut entraîner des troubles cognitifs et psychomoteurs. Ces effets, qui sont déjà graves chez un sujet sain, sont d'autant moins bien tolérés par un patient atteint d'un cancer et sous chimiothérapie. Cependant, le potentiel additif des substances dérivées des cannabinoïdes reste à être démontré, s'il existe.

D'un autre côté, il semble plus envisageable de développer des thérapies ciblant le récepteur CB2. Ce récepteur n'a aucun lien avec les effets psychotropes induits par certains cannabinoïdes.

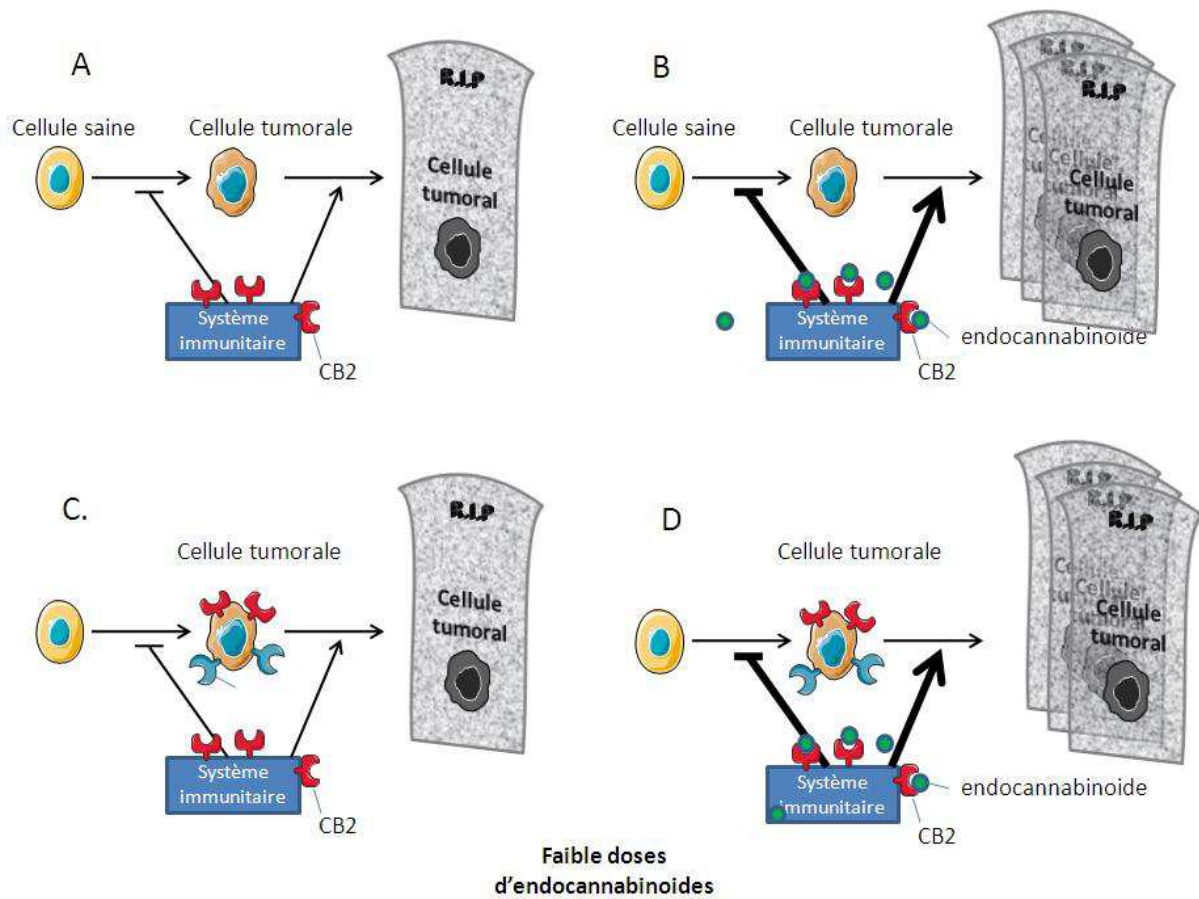
Ne pas oublier les effets délétères des endocannabinoïdes sur l'immunité. Ceux-ci sont clairement dépendants de la dose utilisée et donc une concentration évitant une réduction de l'activité du système immunitaire mais suffisante pour être efficace dans la lutte contre les tumeurs reste à être testée.

La balance bénéfices/risques est également à prendre en compte. En effet, si une dose forte d'agonistes endocannabinoïdes ciblant CB1 ou CB2 ou les deux peut améliorer significativement le pronostic vital d'un patient atteint d'un cancer, les effets délétères sur le système immunitaire et/ou le système nerveux pourraient être mis au second plan, pour être traités secondairement, (Figure 11 et 12) en sachant que le simple arrêt de la prise de cannabinoïdes permet une résolution de la plupart des effets psychomoteurs et nerveux.



**Figure 11** : Interaction système immunitaire, endocannabinoïdes à fortes doses et cancer.

**A**, le système immunitaire prévient la formation des cancers et élimine les cellules tumorales. **B**, certains types de cellules tumorales sont résistantes à l'action des endocannabinoïdes car elles n'expriment pas les récepteurs CB1 et CB2. Dans ce cas, les endocannabinoïdes utilisés à fortes doses favorisent la survenue d'un cancer en inhibant la réponse immunitaire. **C**, En revanche certaines tumeurs expriment CB1 et/ou CB2. **D**, Dans ce cas il y a une balance entre l'action pro-apoptotique directe des endocannabinoïdes et leur action immunosuppressive qui favorise de façon indirecte la croissance tumorale.



**Figure 12 :** Interaction système immunitaire, endocannabinoïdes à faibles doses et cancer.

**A,** le système immunitaire prévient la formation des cancers et élimine les cellules tumorales. **B,** certains types de cellules tumorales sont résistantes à l'action des endocannabinoïdes car elles n'expriment pas les récepteurs CB1 et CB2. Dans ce cas, les endocannabinoïdes utilisés à faibles doses augmentent l'activité anti-tumorale du système immunitaire. **C,** Certaines tumeurs expriment CB1 et/ou CB2. **D,** Dans ce cas les endocannabinoïdes n'ont pas d'effet significatif sur la survie des cellules tumorales et augmentent l'activité anti-tumorale du système immunitaire.



## Objectifs du travail de thèse

L'objectif de mon travail de thèse a été d'évaluer les effets de 2 ligands endocannabinoïdes, l'Anandamide et le 2-AG, sur l'immunité innée anti-tumorale et plus particulièrement sur les cellules Natural Killer.

Les cellules Natural killer sont parmi les premières cellules à détecter la présence de cellules du soi modifiées, telles que les cellules tumorales. Les cellules NK ont la capacité de lyser ces cellules anormales et empêcher ainsi la progression de la tumeur. Cependant, l'un des mécanismes utilisés par les cellules tumorales pour échapper à la surveillance du système immunitaire est de favoriser un environnement immunosuppresseur autour du site tumoral. Concrètement, les cellules tumorales vont sécréter des molécules qui vont inhiber la réponse immunitaire, telles que le TGF $\beta$  ou l'IL-10. Les cellules tumorales vont également favoriser la mise en place d'un réseau vasculaire dont la conformation ne permet pas la diffusion de cellules du système immunitaire au sein de la tumeur (diamètre des vaisseaux trop petit, présence de nombreux coudes).

Le système endocannabinoïde cible deux grands systèmes, le système nerveux et le système immunitaire. Si, à fortes doses (de l'ordre du micromolaire), les ligands endocannabinoïdes ont essentiellement une activité immunosuppressive, peu d'études ont évalué leur effets à faibles doses (de l'ordre du nano molaire). Les premiers résultats publiés semblent indiquer une activité pro-inflammatoire des ligands endocannabinoïdes lorsqu'ils sont administrés en faible quantité. Par ailleurs, utiliser des doses faibles permet de se rapprocher des conditions physiologiques.

Mon travail de thèse a été d'évaluer les effets des endocannabinoïdes AEA et 2-AG, utilisés à faible dose sur les cellules NK. Ces études ont été menées *in vitro* et *in vivo*.

Une première série de résultats montre que ces ligands endocannabinoïdes utilisés à faible dose, entraînent une augmentation de l'activité immuno-régulatrice des cellules NK, objectivée par la production d'IFN $\gamma$ , ainsi qu'une augmentation de leur activité cytotoxique dépendante de FasL vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires tumorales de cancer colorectal et de lymphome.

## Introduction

Le système endocannabinoïde exerce ses effets principalement sur le système nerveux et sur le système immunitaire. Il est constitué de deux récepteurs principaux, CB1 et CB2. Au niveau du système immunitaire, toutes les cellules expriment constitutivement le récepteur CB2 mais pas ou peu le récepteur CB1. Le système endocannabinoïde possède aussi des ligands, dont les deux principaux sont l'AEA et le 2-AG. Ces deux ligands sont le produit de la conversion chimique des phospholipides membranaires. Les enzymes réalisant la biosynthèse de ces ligands ainsi que leur dégradation font également partie du système endocannabinoïde. Toutes les cellules du système immunitaire sont capables de produire les ligands AEA et 2-AG.

Les différentes études réalisées sur le rôle des endocannabinoïdes sur le système immunitaire font surtout état d'une forte inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires, et de la prolifération des lymphocytes T et d'une augmentation de la production de cytokines immunosuppressives par les cellules myéloïdes. Cependant, quelques articles décrivent un rôle pro-inflammatoire du système endocannabinoïde lorsque ses ligands sont utilisés à faible dose (de l'ordre du nano molaire). Ainsi, le 2-AG permet le recrutement par chimiotactisme des cellules myéloïdes et des cellules NK et l'AEA potentialise la production d'IFN $\gamma$  dans un modèle murin d'inflammation.

Les cellules NK font partie de l'immunité innée et constituent la première ligne de défense contre des cellules infectées ou anormales (cellules tumorales). Les cellules NK ont une activité lytique qui peut être activée selon différents mécanismes. Cette activation survient soit après un contact direct avec la cellule cible soit par l'intermédiaire de médiateurs solubles tel que les interleukines IL-12, IL-15, IL-2 ou IL-18. L'activité cytotoxique est très finement régulée et contrôlée. Ainsi, les cellules NK doivent recevoir plusieurs signaux pour s'activer. Lors d'une activation due à un contact cellule/cellule, les signaux sont intégrés *via* différents récepteurs activateur ou inhibiteur présents à la surface des cellules NK. Si la cellule cible n'est pas infectée ou anormale, les récepteurs inhibiteurs empêchent l'activité lytique. En revanche, si la cellule NK entre en contact avec une cellule tumorale, ce sont les récepteurs activateurs de la cytotoxicité qui seront majoritairement stimulés. Leur engagement entraîne la lyse de la cellule cible.

La biologie des cellules NK est donc dépendante de nombreux facteurs immunitaires mais également de facteurs non immunitaires. Dans ce cadre nous nous sommes intéressés à la régulation des activités immunorégulatrices et cytotoxiques des cellules NK par les ligands endocannabinoïdes, AEA et 2-AG.

## Principaux résultats

A faible dose, les endocannabinoïdes AEA et 2-AG potentialisent la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK stimulées avec des doses suboptimales d'IL-12, d'IL-2 ou d'IL-15. Cet effet est dépendant de la dose et du temps d'activation. Cette augmentation de production d'IFN $\gamma$  est associée à une augmentation de la production de son ARNm. Les endocannabinoïdes induisent aussi une augmentation de l'expression du CD69 (marqueur d'activation des cellules lymphoïdes). L'effet activateur des endocannabinoïdes AEA et 2-AG est également observé sur la lignée de cellules NK humaines NK92 préalablement stimulées avec des doses suboptimales d'IL-12, d'IL-2 ou d'IL-15.

Les ligands AEA et 2-AG entraînent également une potentialisation de la cytotoxicité dépendante de Fas/FasL. En effet seules les lignées cellulaires exprimant le récepteur Fas (les lignées Jurkat et SW480) sont sensibles à l'activité lytique des cellules NK induite par les endocannabinoïdes AEA ou 2-AG. D'autre part, les ligands AEA et 2-AG induisent une augmentation de l'expression du récepteurs FasL à la surface des cellules NK lorsqu'ils sont utilisés à faible dose. Cette augmentation d'expression de FasL est corrélée à une augmentation de la production de l'ARNm codant FasL. En revanche aucune variation significative de l'expression de TRAIL, Perforine ou Granzyme B n'est observé suite à la stimulation des NK par les ligands AEA ou 2-AG.

L'utilisation de l'antagoniste du récepteur CB2 inhibe à la fois la production d'IFN $\gamma$  et la cytotoxicité induite par les ligands endocannabinoïdes. L'effet des endocannabinoïdes sur les cellules NK passe donc par le récepteur CB2.

Afin de valider ces résultats *in vivo* nous avons reproduit les expériences de potentialisation chez la souris (BALB/c). Pour le versant immuno-régulateur, Les endocannabinoïdes AEA et 2-AG induisent une augmentation de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK murines stimulées avec une dose suboptimale d'IL-12.

En ce qui concerne l'évaluation *in vivo* de la potentialisation de la cytotoxicité dirigée contre des cellules tumorales, nous avons utilisé un model de tumeur sous cutané (injection de cellules de la lignée CT26 dans le flanc des souris). L'injection intra-tumorale de cellules NK stimulées *ex-vivo* par l'AEA induit un ralentissement significatif de la croissance tumorale.

# **The endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol activate human Natural Killer cells**

**Thomas Bouachour<sup>1,2,3</sup>, Charline Miot<sup>1,2,3</sup>, Céline Beauvillain<sup>1,2,3,4</sup>, Pascale Jeannin<sup>1,2,3,4</sup>, Yves Delneste<sup>1,2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> LUNAM Université, Université d'Angers, Angers, France;

<sup>2</sup> Inserm, UMR 892, Angers, France;

<sup>3</sup> CNRS, UMR 6299, Angers, France

<sup>4</sup> CHU Angers, Laboratoire d'Immunologie et d'Allergologie, Angers, France.

PJ and YD contributed equally to this study

Address correspondence and reprint requests to Yves Delneste or Pascale Jeannin, CHU Angers, Institut de Biologie en Santé, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. E-mail addresses: [yves.delneste@univ-angers.fr](mailto:yves.delneste@univ-angers.fr) or [pascale.jeannin@univ-angers.fr](mailto:pascale.jeannin@univ-angers.fr)

**Running title:** Endocannabinoids activate NK cells

**Key words:** NK cells, Endocannabinoids, Fas ligand, cytotoxicity

**Abbreviations:** 2-AG, 2-arachidonoylglycerol; AEA, Arachidonoyl ethanolamide; CB, cannabinoid receptor; DC, dendritic cells; FasL, Fas ligand; NK, Natural Killer; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  ; TRAIL, Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand.

## **Abstract**

The endocannabinoids anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) regulate the immune system and the anti-tumor defense. In this study, we show that AEA and 2-AG stimulate highly pure natural killer cells (NK) cells (CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>) and NK92 cell line. At low doses, they potentiate the production of IFN $\gamma$  induced by suboptimal doses of IL-12, IL-15 and IL-2. In addition, AEA and 2-AG potentiate the cytotoxicity of NK cells. Some

experiences of quantification of the expression of the transcript encoding FasL, TRAIL, perforin and granzyme and some experiences of inhibition indicate that this increase of the cytotoxicity is associated to an increase of FasL expression while the production of granzyme, perforin and TRAIL expression remains unchanged. These results showed that the endocannabinoids AEA and 2-AG used at low dose could be important for the anti-tumoral activity of the immune system.

## **Introduction**

Endocannabinoids represent a recently identified family of arachidonic acid-derived signalling molecules. They are synthesized through the hydrolysis of membrane precursors and released “on demand” by neurons and peripheral cells [1]. The endocannabinoid system consists in (i) two major ligands, N-arachidonylethanolamide (anandamide or AEA) [2] and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) [3, 4], and (ii) three receptors, two G-protein-coupled cannabinoid receptors, CB1 and CB2 [5] [6] and a cationic channel, TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1 channel). CB1 and CB2 bind AEA and 2-AG. CB1 is mainly expressed in the CNS areas associated with motor control, emotional responses, motivated behaviour and energy homeostasis [7], and in some peripheral tissues (such as liver or adipose tissue) [8, 9]. CB2 is mainly expressed on immune cells (including B, T, and NK lymphocytes) [10]. TRPV1 binds AEA, but not 2-AG, and is mainly expressed by sensitive nerves [11]. Initially identified as a receptor for the endogenous lysophospholipid LPI, GPR55 has been recently suspected a candidate endocannabinoid receptor [12]. However, the physiological roles of endocannabinoid-induced signaling mediated via GPR55 remain unclear, as both agonist and antagonist effects have been reported [13] [14].

The endocannabinoid system modulates diverse central and peripheral physiological functions, such as movement [15], learning, food intake [16], human reproduction [17], emesis [18], control of body temperature and pain [19].

Some studies have reported that endocannabinoids may also regulate immune responses. Endocannabinoids are chemotactic and cross-desensitize cells to chemotaxis induced by chemoattractants [20] [21]. They decrease, in a dose-dependent manner, the proliferation of human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells through an inhibition of IL-2 synthesis [22]. Endocannabinoids inhibit the production of TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and IL-17 by activated T cells [23]. They also suppress

CD8<sup>+</sup> T cell migration and induce DC and macrophage apoptosis. Interestingly,  $\Delta$ -9-tetrahydrocannabinol (THC), the major psychoactive cannabinoid compound of marijuana, suppresses Th1 and promotes Th2-biased immune responses [24] [25]. The immunomodulatory properties of endocannabinoids have been also reported in different preclinical models of chronic inflammatory diseases [26]. In contrast, others studies have reported that endocannabinoids may exhibit pro-inflammatory properties [27] [21] [28]. As an example, 2-AG potentiates the production of IL-8 and MCP-1 [29] and the 2-AG/CB2 axis is involved in the acute inflammation induced by the topical application of TPA [30].

Natural Killer (NK) cells are innate lymphocytes cells exhibiting potent and highly regulated cytotoxic properties [31]. They are involved in the killing of virus-infected cells and some tumoral cells *via* direct and indirect lytic pathways. Lysis can be mediated either by the secretion of preformed enzymes (such as granzyme and perforin) or *via* the interaction of the homotrimeric membrane molecules TRAIL, Fas ligand (FasL) and TNF $\alpha$  with their respective death receptors. The release by proteolytic cleavage of these membrane molecules, is induced upon activation [32].

The cytotoxic activity of NK cells is tightly regulated by the interaction of activating and inhibitory receptors with their counterreceptors expressed by target cells [33] [34]. The development, survival, proliferation and effectors functions of NK cells are strictly controlled by IL-2, IL-12, IL-15 and IL-18 [35] [36]. NK cells also exhibit regulatory properties *via* the production of various cytokines such as IFN $\gamma$  and IL-1 $\beta$  [37]. More recently, studies have reported that NK cells have characteristics of both innate and adaptive immunity, such as memory [38] and functional polarization (NK22 cells) [39].

As most immune cells, NK cells can be regulated by neuropeptides, such as catecholamines [40] and  $\beta$ 2-receptor agonists [41]. Studies have also reported that the biology of NK cells, which express the endocannabinoids CB1 and CB2 [42] [43], can be modulated by endocannabinoids [44]. THC was first reported to inhibit the lytic activity of NK cells (Specter, 1986). In contrast, a study reported that THC potentiates the activation of NK cells, as evidenced by an increase of CD25 expression [45]. Moreover, 2-AG is chemoattractant for NK cells [46]. However, the role of endocannabinoids on the biology of NK cells, and especially on their cytotoxic activity, remains unclear. The aim of this study was thus to evaluate the ability of endocannabinoids to modulate human NK cells.

## Materials and Methods

### *Isolation of NK cells*

Human PBMC (Blood collection center, Angers, France) were isolated from healthy volunteers by standard density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham Bioscience, Uppsala Sweden). CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK cells were purified from PBMC, as previously described [47]. Briefly, after an initial enrichment step using anti-CD56 Ab-coated microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK cells were purified by FACS sorting (FACS Aria® ; Beckton Dickinson, Erembodegen, Belgium) after labeling with APC-labeled anti-CD56 and FITC-labeled anti-CD3 mAbs (both from BD Biosciences, San Jose, CA); the anti-CD56 Abs used for isolation and cytometry recognize different epitopes. The purity of human NK cells was routinely >99% (Supplemental Fig. 1). Cells were cultured in complete medium consisting in RPMI 1640 medium (Lonza, Vervier, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, Nuaillé, France), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 10 mM Hepes, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (all from Lonza).

Murine NK cells were purified, as previously described [47]. Briefly, cells were isolated from spleen of 6-8 weeks-old BALB/c mice (Janvier, St Berthevin, France) by negative selection using the mouse NK cell enrichment kit (StemCell technologies, Grenoble, France). DX5<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> cells were then sorted by negative selection, using anti-CD3ε mAb-coated microbeads followed by a positive selection using anti-DX5<sup>+</sup> mAb-coated microbeads (both from Miltenyi Biotec). The purity of the DX5<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK cells was > 99% (Supplemental Fig. 1). Murine NK cells were cultured in complete medium.

### *Cell lines*

The human NK cell line NK92 (kindly provided Dr. H Vie, Nantes, France) was cultured in complete medium supplemented with 150 U/mL IL-2 (Immunotools, Friesoythe, Germany). The human cell lines K562, Jurkat, SW480 and SW620 were obtained from ATCC (Manassas, VA). Jurkat, SW480 and SW620 were cultured in complete medium. K562 cells were cultured in complete IMDM medium (Lonza) supplemented with 10% FCS. The murine colon adenocarcinoma cell line CT26 (ATCC) was maintained in complete medium.



### *Cell activation*

Purified human NK cells and NK92 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were cultured for 6 to 48 hours with or without 0.001-10  $\mu$ M AEA or 2-AG (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA), in the absence or presence of 1 ng/mL IL-12, 5 ng/mL IL-15 or 50 U/mL IL-2 (all from Immunotools). In some experiments, cells were incubated with 1  $\mu$ M SR144582 (CB2 inhibitor) or SR141716A (CB1 inhibitor) (both from Santa Cruz biotechnology). NK92 cells were cultured for 24 h without IL-2 before activation with endocannabinoids.

Murine NK cells were activated for 48 h with or without 0.5 ng/mL IL-12 (eBioscience, San Diego, CA), in the absence or presence of 10 ng/mL AEA or 2-AG.

### *Cytokine quantification*

Human IFN $\gamma$  (Diaclone, Besançon, France) and human FasL (R&D Systems, Abingdon, UK) were quantified by ELISA. TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES were quantified by Bioplex (Biorad, Hercules, CA). Murine IFN $\gamma$  was quantified by ELISA (eBioscience). Results are expressed in pg/mL, or as a percentage of increase, determined as follows:  $(A-B/B) \times 100$ , where A and B correspond to the levels of cytokines produced in the presence or absence of endocannabinoids, respectively.

### *Flow cytometry*

The cell viability was measured by flow cytometry using annexin V and propidium iodide. The expression of TRAIL and FasL on NK cells was evaluated by flow cytometry. Cells were incubated with PE-labeled anti-TRAIL or biotinylated anti-FasL mAbs (both from BD Biosciences). Anti-FasL mAb was detected using PE-labeled streptavidin (BD Biosciences). The expression of CD107a was analyzed to monitor NK cell degranulation [48]. IL-12 primed-NK cells were stimulated without or with AEA for 48 h before culture with Jurkat cells at an effector:target cell ratio of 1:1 with FITC-labeled anti-CD107a for 4 h in FCS-free RPMI 1640 medium. Cells were then washed in cold PBS and incubated with APC-labeled anti-CD56 and PE-labeled anti-CD3 mAbs before analysis by flow cytometry (FACScalibur<sup>®</sup> cytometer; Beckton Dickinson, Erembodegen, Belgium). Control mAbs were from BD Biosciences.

### *Analysis of mRNA expression*

Human IFN $\gamma$ , FasL, TRAIL, CD69, CB1, CB2, TRPV1 and GPR55 mRNA expression was analyzed by RT-qPCR. Briefly, total RNA was extracted using Trizol reagent and reverse transcribed using the superscript II RNaseH<sup>-</sup> reverse transcriptase (both from Invitrogen, Carlsbad, CA). RNA integrity and cDNA synthesis were verified by amplifying GAPDH cDNA. Amplification was done using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method using GAPDH as calibrator. The primer sequences are available upon request.

### *In vitro cell cytotoxicity assay*

After stimulation, human NK cells were washed in PBS before culture for 4 hours with the target cell lines, at the effector:target cell ratio of 10:1. In some experiments, the cytotoxicity assay was done in the presence of a neutralizing anti-Fas mAb (clone ZB4; [49]) or a control antibody (both from MBL international, Woburn, MA). Supernatants were collected and used to measure the LDH released by damaged or lysed cells, using a commercial kit (CytoTox 96<sup>®</sup> non-radioactive cytotoxicity assay; Promega, Madison, WI). Results are expressed as a percentage of cytotoxicity determined as follows: ((experimental – effector spontaneous – target spontaneous) / (target maximum – target spontaneous)) x 100.

### *In vivo experiments*

The CT26 cells were resuspended in PBS at a concentration of  $0.1 \times 10^6$  cells/mL. Female BALB/c mice (6-8 weeks) were implanted subcutaneously with  $1 \times 10^4$  CT26 cells in the right flank. After 15 days, mice were randomly assigned to two groups (5 mice per group), and were injected intratumorally with  $0.5 \times 10^6$  NK cells stimulated with 0.5 ng/mL IL-12, without or with 10 nM AEA, respectively. Tumor growth was assessed daily by measuring the two greatest perpendicular tumor dimensions using calipers. Tumor volume ( $\text{mm}^3$ ) was calculated as follows: tumor length (mm) x tumor width ( $\text{mm}^2$ )/2. [50]. Results were expressed as a percentage increase of tumor volume (mean  $\pm$  SD) (Wang, Clin Cancer Res, 2002, 8:1940). Mice were sacrificed on day 30 after tumor cell injection.

## *Statistical analysis*

Data were analyzed by the paired Student's *t* test. \* $p < 0.05$  was considered significant.

## **Results**

### *AEA and 2-AG induce IFN $\gamma$ production by human NK cells*

We first evaluated the ability of AEA and 2-AG to modulate the production of IFN $\gamma$  by highly pure human NK cells. Results showed that 10 nM AEA and 2-AG potentiated the production of IFN $\gamma$  (quantified at 48 h) by human NK cells stimulated with a suboptimal concentration of IL-12 ( $450 \pm 155\%$  increase), IL-15 ( $90 \pm 44\%$  increase) or IL-2 (% increase =  $195 \pm 93\%$ ; mean  $\pm$  SEM,  $n=5$ ) (Fig 1A). A similar potentiating effect was observed using 2-AG plus IL-12 ( $345 \pm 95\%$  increase), IL-15 ( $195 \pm 93\%$  increase) or IL-2 ( $198 \pm 30\%$  increase) (Fig 1A). As the highest activation by endocannabinoids was evidenced using NK cells primed with IL-12, the following experiments were done mainly with this cytokine. The increase of IFN $\gamma$  production induced by AEA and 2-AG was associated to an increase of IFN $\gamma$  mRNA expression (Fig 1B and data not shown). The ability of AEA (Fig 1C) and 2-AG (data not shown) to potentiate the IL-12-induced IFN $\gamma$  production was significant at 1 nM and maximal at 10 nM. However, higher concentrations (1 and 10  $\mu$ M) of AEA (Fig. 1C) and 2-AG (data not shown) inhibited the IL-12-induced IFN $\gamma$  production; the inability of 1 and 10  $\mu$ M AEA and 2-AG to modulate IFN $\gamma$  production was not associated to NK cell death (Fig 1D). Similar results were obtained using 50 U/mL IL-2 and 5 ng/mL IL-15 (data not shown). The potentiating effect of 10 nM AEA (Fig 1E) and 2-AG (data not shown) was detectable after 24 h and maximal at 48 h of stimulation. AEA also increased the production of TNF $\alpha$ , RANTES, IL-6 and IL-1 $\beta$  by IL-12-primed NK cells (Fig. 1F). We also observed that AEA and 2-AG increased the expression of the activation marker CD69, at the mRNA (Fig 1G and data not shown) and protein levels (Fig 1H). Finally, 10 nM AEA and 2-AG, in combination with suboptimal concentrations of IL-12, IL-2 and IL-15, also induced the production of IFN $\gamma$  by NK92 cells (Fig 1I).

AEA and 2-AG, used alone, did not modulate the production of IFN $\gamma$  (Fig 1A and data not shown) nor the viability (data not shown) of NK cells and NK92 cells, whatever the concentrations used and the time of analysis.

These results showed that the endocannabinoids AEA and 2-AG activate human NK cells.

#### *AEA and 2-AG potentiate the cytotoxic activity of NK cells*

We next evaluated whether AEA and 2-AG may modulate the cytotoxic activity of NK cells. The FasL-sensitive cell lines Jurkat and SW480 [51] [52] and the FasL-resistant cell lines K562 and SW620 [51] [52], were used as targets cells. Results showed that 10 nM AEA potentiated the cytotoxic activity of IL-12-primed human NK cells against Jurkat ( $38 \pm 15\%$  and  $17 \pm 11\%$  cytotoxicity, in the presence and absence of AEA, respectively) and SW480 cells ( $48 \pm 5\%$  and  $26 \pm 2\%$  cytotoxicity, respectively) (Fig 2A). A similar potentiating effect was also observed with 2-AG (data not shown). In contrast, AEA and 2-AG did not potentiate the cytotoxic activity against K562 and SW620 cells (Fig. 2A and data not shown). AEA and 2-AG also increased the cytotoxic activity of NK92 cells against Jurkat and SW480, but not K562 and SW620 cells (Fig 2B and data not shown). As controls, NK cells and NK92 cells, activated with optimal concentrations of IL-2 or IL-2 plus IL-12, induced the killing of the four cell lines tested (Fig. 2A&B and data not shown).

These results showed that the endocannabinoids AEA and 2-AG increase the cytotoxic activity of NK cells.

#### *AEA and 2-AG potentiate the FasL-mediated NK cell cytotoxicity*

The fact that AEA and 2-AG potentiated the killing of FasL-sensitive but not FasL-resistant cells suggested that endocannabinoids may increase the expression of the death molecules FasL and/or TRAIL. An increase of membrane FasL expression on NK cells was observed after stimulation by AEA (Fig 3A), at a level similar to the one induced by IL-2, used as a positive control [53]. The increase of membrane FasL expression was associated to the release of soluble FasL, as evidenced in the 48 h supernatants of NK cells and NK92 cells stimulated with AEA plus IL-12 (Fig 3B). As a positive control, soluble FasL was also detected in the supernatants of NK92 cells stimulated with 400 U/mL IL-2 (Fig. 3B). The increase of FasL expression induced by AEA and 2-AG was associated to an increase of the mRNA encoding

FasL (Fig 3C and data not shown). In contrast, TRAIL was not modulated, at the protein and mRNA levels, by AEA (Fig. 3A&C) and 2-AG (data not shown). As a positive control [54], the expression of membrane TRAIL on NK cells was induced by IFN $\alpha$  (Fig. 3A).

We next evaluated the role of Fas-FasL in the cytotoxic activity of endocannabinoid-activated NK cells. Results showed that the cytotoxic activity of AEA-stimulated NK cells against Jurkat cells was reduced by an anti-Fas mAb (inhibition of  $42 \pm 18\%$ ; mean  $\pm$  SD, n= 4), but not by a control mAb (Fig 3D). Similar results were obtained using SW480 as target cells (data not shown). The neutralizing anti-Fas mAb also inhibited the killing of SW480 and Jurkat cells mediated by 2-AG-stimulated NK cells (Fig 3D and data not shown). Similar inhibition was observed using 2-AG- and AEA-stimulated NK92 cells used as effector cells (data not shown). In agreement with studies showing that soluble FasL has no cytotoxic activity *per se*, the supernatants of NK cells stimulated for 48 h with 10 nM AEA, containing soluble FasL (Fig. 3A), did not induce the death of Jurkat (Fig 3E) and SW480 cells (data not shown), suggesting that soluble FasL, induced by endocannabinoids, was not involved in the cytotoxic activity of NK cells.

Finally, in agreement with the fact that AEA and 2-AG potentiated the killing of FasL-sensitive but not FasL-resistant cells, suggesting that they did not trigger the release of perforin and granzyme, we observed that AEA (Fig 3F) and 2-AG (data not shown), failed to induce the expression of CD107a, a surrogate marker of granule exocytosis [48], on NK cells. Moreover, the expression of the mRNA encoding perforin and granzyme B was not modulated by AEA (Fig 3C).

These results showed that the potentiating role of AEA and 2-AG on NK cell cytotoxic activity is mediated by an increase of FasL expression.

#### *AEA and 2-AG activate human NK cells via CB2*

AEA and 2-AG exert their action via the CB1, CB2, TRPV1 and GPR55 receptors [10] [55] [14]. In agreement with previous studies, CB2 mRNA is strongly expressed by NK and NK92 cells, while, in contrast, the transcripts encoding CB1, TRPV1 and GPR55 were not expressed or expressed at low levels (Fig 4A). The expression of these mRNA was not modulated by activating concentrations of IL-2 (150 U/mL), IL-12 (50 ng/mL) or IL-15 (50 ng/mL) (Fig 4A). The specific CB2 receptor antagonist SR144528 inhibited the secretion of IFN $\gamma$  ( $87 \pm 10$  % inhibition; mean  $\pm$  SEM; n=4) (Fig 4B) and the cytotoxic activity of NK cells induced by

AEA (Fig 4C). This inhibitory effect was not associated to a toxic effect (data not shown). In contrast, and in agreement with the absence of CB1 and GPR55 on NK cells, the CB1 antagonist SR141716A did not inhibit the ability of AEA to potentiate the production of IFN $\gamma$  (Fig. 4B) and the cytotoxic activity of NK cells (data not shown). Similar results were obtained using 2-AG (data not shown). Finally, the production of IFN $\gamma$  and the cytotoxic activity of NK cells induced by optimal concentrations of IL-2 were not modulated by SR144528 and SR141716A (Fig. 4B and data not shown).

These results showed that the potentiating activities of endocannabinoids on human NK cells were mediated via CB2.

#### *NK cells activated by endocannabinoids delay tumor growth*

Finally, we evaluated whether endocannabinoids may potentiate in vivo the cytotoxic activity of NK cells. In a first set of experiments, we analyzed the ability of AEA and 2-AG to activate in vitro highly purified murine NK cells. Results showed that 10 nM AEA and 2-AG increased the production of IFN $\gamma$  (increase of  $76 \pm 25$  and  $99 \pm 34\%$ , respectively; mean  $\pm$  SEM, n=3) by NK stimulated with 0.5 ng/mL IL-12 (Fig. 5A). In a second set of experiments, we evaluated whether murine NK cells activated with AEA may delay tumor growth. NK cells were activated or not for 48 h with 10 nM AEA, in the presence of IL-12, before intratumoral injection in CT26 tumor-bearing mice. NK cells were injected 15 days post-implantation of tumor cells (mean tumor volume  $\sim 400 \text{ mm}^3$ ). Results showed that AEA-activated NK cells delay the growth of CT26, compared to non treated NK cells (Fig. 5D). The tumor volume was significantly lower, at day 4, in mice injected with AEA-activated NK cells, compared to non treated NK cells (% increase of tumor volume of  $131 \pm 31$  and  $237 \pm 45 \%$ , respectively; mean SEM, n=5). The difference between the two groups of mice remained significant until day 6 post-injection (Fig. 5D). the two curves were superposable at day 15.

## Discussion

NK cells play a major role in the protection against tumoral and infected cells, and in immune regulation. Their biological activities are tightly controlled, especially by immune and non immune mediators produced locally. In this study, we report that the endocannabinoids AEA and 2-AG activate NK cells. They induce the production of cytokines and chemokines and increase FasL-dependent cytotoxic activity. Finally, AEA-treated NK cells are more efficient than non treated cells in controlling *in vivo* the growth of a FasL-sensitive tumor cell line.

Immune cells are sensitive to endocannabinoids. However, studies have reported opposite effects (i.e. activation versus inhibition) on most cell types. In most cases, discrepancies have been related to the concentrations of endocannabinoids used. In the micromolar range, the endocannabinoids are strongly immunosuppressive, AEA used at 1-100  $\mu\text{M}$ , inhibits the activation and proliferation of T cells [23] and induces the apoptosis of B and T lymphocytes [22]. *In vivo*, high concentrations of cannabinoids inhibit the antimicrobial and immunoregulatory properties of macrophages [56]. In contrast, nanomolar concentrations exhibit a stimulatory activity. As an example, low concentrations of AEA increase, *in vivo*, the production of IFN $\gamma$  by dendritic cells [57]. Similar dose-dependent effects were also observed in our study. Results showed that the stimulatory activity of endocannabinoids on NK cells was evidenced at the nanomolar concentrations while, in contrast, no effect was observed at concentrations higher than 10  $\mu\text{M}$ . High concentrations (>10  $\mu\text{M}$ ) of endocannabinoids were reported to induce lymphocyte apoptosis [22]. In our experimental conditions, we did not observe any toxic effect of endocannabinoids on NK cells. This result may be explained by (i) the presence of suboptimal concentrations of IL-2, IL-12 or IL-15 in the culture medium, which may induce the survival of NK cells [58] or (ii) by a desensitization of the CB2 receptor on NK cells in response to high doses of endocannabinoids. Interestingly, the physiological concentrations of endocannabinoids are within the nanomolar range [59, 60], suggesting that the activation of NK cells by endocannabinoids may occur *in vivo*.

CB2 is the main endocannabinoid receptor expressed by immune cells [61]. Consequently, most if not all effects of AEA and 2-AG on immune cells (induction of migration, proliferation and cytokine production) are mediated via CB2. NK cells have been reported expressing both CB1 and CB2 [43]. However, we observed that CB2 is the only

endocannabinoid receptor expressed by human NK cells, as assessed by RT-qPCR. Accordingly, the immunostimulatory activity of AEA and 2-AG on the production of IFN $\gamma$  was inhibited by the CB2 antagonist but not by the CB1 antagonist, allowing excluding a role for CB1 and GPR55 [62]. Even though 2-AG has a higher affinity for CB2 than AEA [3], we observed that the biological activities of AEA and 2-AG on NK cells are superimposable. The expression of the cannabinoid receptors can be modulated by numerous signals, including inflammatory signals. However, the expression of CB1, CB2 and TRPV1 by NK cells (evaluated at the transcriptional level) was not modulated by endocannabinoids and by stimulatory cytokines IL-2, IL-12 or IL-15.

Interestingly, we observed that the stimulatory activity of AEA and 2-AG was long lasting, as the increase of IFN $\gamma$  production, detectable at 12 h, was maintained after 48 h activation, suggesting that a short term treatment with endocannabinoids may be sufficient to induce a long time activation of NK cells.

Endocannabinoid may have stimulatory or suppressive properties, depending on the nature of the cell target, the type of endocannabinoids and the costimulatory molecules used. Most of the immunoregulatory properties of endocannabinoids have been evidenced on T and B cells and professional APCs (macrophages and dendritic cells) [26, 63]. In this study, we observed that the endocannabinoids AEA and 2-AG increased the production of IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and Rantes, and the expression of the activation marker CD69 by NK cells. For all the parameters analyzed, the activation was observed at concentrations  $\leq 10$  nM on purified human NK cells and on the cell line NK92, allowing excluding a potential role of contaminating cells in NK cells activation. Previous studies reported that endocannabinoids activate NK cells. High concentrations of endocannabinoids have been reported to inhibit the production of cytokines and chemokines and the cytotoxic activity of NK cells [64, 65]. In contrast, lower concentration of AEA are chemotactic for NK cells *in vitro* [46]. Moreover, the NK-like cell line NKB61A2 expresses higher levels of CD25 upon stimulation with THC [66].

*In vivo*, endocannabinoids and phytocannabinoids suppress cell-mediated immunity and favor the initiation of Th2-biased immune responses. However, and in agreement with a study showing that a low concentration of AEA increases the production of IFN $\gamma$  by myeloid cells [57], we observed that endocannabinoids, by inducing the production of IFN $\gamma$ , may favor the initiation of Th1 immune responses by acting directly on T cells or by favoring the production



of IL-12. These results suggest that endocannabinoids, though the regulation of cytokines production, may participate to the immunoregulatory property of NK cells.

NK cells have potent and highly regulated cytotoxic properties. We observed that the endocannabinoids AEA and 2-AG potentiated the cytotoxicity of purified NK cells and NK92 cells induced by IL-12. This result is, to the best of our knowledge, the first report on the capacity of endocannabinoids to increase the cytotoxic activity of NK cells. NK cell cytotoxicity can be mediated *via* exocytosis of granules containing lytic enzymes (such as perforin and granzymes) or *via* the interaction of members of the TNF superfamily with their corresponding death receptors. We observed that cytotoxic activity induced by endocannabinoids resulted from an increase of membrane FasL (TNFSF6) expression. In contrast, no effect was observed on the expression of TRAIL (TNFSF10). A previous study reported that the recruitment of Fas/FasL in lipid rafts of cholangio-carcinoma cells promotes an antiproliferative and pro-apoptotic response [67].

, AEA and 2-AG did not increase the expression of the mRNA encoding perforin and granzyme B. Accordingly, AEA- and 2-AG-activated NK cells were able to kill the FasL-sensitive tumor cells Jurkat and SW480, but not the FasL-resistant cells K562 and SW620. Supporting a pivotal role for FasL in endocannabinoid-induced NK cell cytotoxicity, the killing of Jurkat and SW480 cells was inhibited by a neutralizing anti-Fas mAb. Moreover, the absence of cytotoxicity induced by the supernatants of endocannabinoid-activated NK cells confirmed the marginal role played by soluble TRAIL in the killing process. The shedding of membrane FasL was not affected by endocannabinoids, suggesting that they did not modulate the expression/activity of metalloproteases involved in the release of soluble FasL. In contrast, the potentiating activity of endocannabinoids on FasL-mediated NK cell cytotoxicity was associated to an increase of FasL mRNA expression.

We observed that endocannabinoids may render activated NK cells more efficient *in vivo* to control the growth of a FasL-sensitive cell line. Even though the potentiating effect was minimal, it is important to underline that the significant delay in tumor growth was obtained after a single injection on AEA-activated NK cells. This result suggests that manipulating locally the endocannabinoid system (by using inducers of endocannabinoid synthesis or inhibitors of endocannabinoid metabolism), may enhance the cytotoxic activity of NK cells. As the regulation of FasL expression appears similar on NK cells and cytotoxic T cells, we can hypothesize that endocannabinoids may also upregulate the killer activity on both cell types.

The biology of NK cells can be regulated by different types of mediators, such as catecholamines and  $\beta$ 2-receptor agonists [68, 69]. This study demonstrates that endocannabinoids activate NK cells and potentiate the FasL-mediated killing activity of NK cells. Importantly, that the stimulatory activity was observed using physiological concentrations of endocannabinoids, suggesting that the potentiating activity may occur *in vivo* in situations characterized by an increased production of endocannabinoids, such as inflammation. This study also underlines the importance of the concentrations used *in vitro*, as regulatory versus stimulatory activities of endocannabinoids can be induced, depending on the concentrations used. In conclusion, this study confirms that endocannabinoids can serve as secondary modulators of NK cells and suggests that manipulating locally the endocannabinoid system may regulate the killing activity of NK cells.

### **Acknowledgments**

This work was supported by institutional grants from Inserm and the University of Angers, Thomas Bouachour received a grant from the Ministère de la Recherche and Charline Miot received a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors sincerely acknowledge Simon Blanchard, Isabelle Frémaux and Samuel Joury for expert technical assistance.

### **Disclosures**

The authors have no financial conflicts of interest.

## Figure legends

**Figure 1. Endocannabinoids activate human NK cells.** **A**, Human NK cells were cultured for 48 h with 1 ng/mL IL-12, 5 ng/mL IL-15 or 50 U/mL IL-2, without or with 10 nM AEA or 2-AG. **B**, Human NK cells were stimulated for 12 h with 1 ng/mL IL-12, without ( $\square$ ) or with ( $\blacksquare$ ) 10 nM AEA. IFN $\gamma$  mRNA expression was assessed by RT-qPCR. Results are expressed in relative expression compared to GAPDH (mean  $\pm$  SD, n=5). **C**, Human NK cells were stimulated for 48 h with 5 ng/mL IL-12 ( $\blacksquare$ ), in the presence of 1-10<sup>4</sup> nM AEA. **D**, Human NK cells were stimulated for 48 h with 1 ng/mL IL-12, without or with 10 nM or 10  $\mu$ M AEA. Cell viability was assessed by FACS by staining with AnnexinV and propidium iodide. Results are representative of one of 5 experiments. Inserts, percentages of positive cells in each quadrant. **E**, Human NK cells were stimulated or not with 1 ng/mL IL-12, in the absence or presence of 10 nM AEA. IFN $\gamma$  was quantified after 6, 12, 24 and 48 h. **F**, Human NK cells were stimulated for 48 h with 1 ng/mL IL-12 and 10 nM AEA. The production of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , Rantes, IL-6 and IL-1 $\beta$  was evaluated by Bioplex. Results are expressed as a percentage of increase of cytokine production (mean  $\pm$  SD, n=5). **G**, Human NK cells were stimulated for 48 h with 1 ng/mL IL-12, without or with 10 nM AEA. The expression of CD69 mRNA was evaluated by RT-qPCR; results are expressed as a relative expression (mean  $\pm$  SD, n=4). **H**, Human NK cells were stimulated for 48 h with 1 ng/mL IL-12, without or with 10 nM AEA or 2-AG. The expression of CD69 was determined by FACS. Red histogram, control mAbs were super imposable with not simulated cells. Results are representative of one of 5 experiments. **I**, The NK92 cells were stimulated for 48 h with 1 ng/mL IL-12, 5 ng/mL IL-15 or 50 U/mL IL-2, without or with 10 nM AEA or 2-AG. **A,C,E,I**, IFN $\gamma$  was quantified by ELISA in the cell culture supernatants. Results are expressed in pg/mL (mean SD, n=5); \*, p<0.05

**Figure 2. Endocannabinoids enhance the cytotoxic activity of human NK cells.** **A**, Human NK cells were not stimulated ( $\square$ ) or stimulated with 1 ng/mL IL-12 ( $\blacksquare$ ), without or with 10 nM AEA. After 48 h, NK cells were cultured with Jurkat, SW180, K562 and SW620 cells for 4 h, at the effector:target ratio of 10:1. Cell death was evaluated by quantifying LDH in the culture supernatants. In some experiments, NK cells were stimulated with 400 U/mL IL-2 without or with xx ng/mL IL-12 (grey histograms). **B**, NK92 cells were not stimulated ( $\square$ ) or stimulated with 1 ng/mL IL-12 ( $\blacksquare$ ), without or with 10 nM AEA or 2-AG, for 48 h. Activated

NK92 cells were then cultured with Jurkat or K562 cells for 4 h, at the effector:target ratio of 10:1. In some experiments, NK cells were stimulated with 400 U/mL IL-2 (grey histograms). **A&B**, Cell death was evaluated by quantifying LDH in the culture supernatants. Results are expressed as a % of cytotoxicity (mean  $\pm$  SD, n=4). \*\*\*,  $p < 10^{-3}$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0$ .

**Figure 3. Endocannabinoids enhance the cytotoxic activity of human NK cells via FasL.**

**A**, Human NK cells were stimulated for 12 h with 10 nM AEA, 1 ng/mL IL-12, 1 ng/mL IL-12 plus 10 nM AEA, 100 ng/mL IFN $\alpha$  or 150 U/mL IL-2. The expression of membrane FasL and TRAIL was analyzed by FACS. Results are representative of 1 of 4 experiments. **B**, Human NK cells and NK92 cells, cultured ( $\square$ ) or not with 1 ng/mL IL-12 ( $\blacksquare$ ), were stimulated or not for 48 h with 10 nM AEA. In some experiments, NK92 cells were stimulated with 400 U/mL IL-2 (grey histogram). Soluble FasL was quantified in the cell culture supernatants by ELISA. Results, expressed in pg/mL, are representative of one of 3 experiments. **C**, Human NK cells, cultured ( $\square$ ) or not with 1 ng/mL IL-12 ( $\blacksquare$ ), were stimulated or not for 12 h with 10 nM AEA. The expression of FasL, TRAIL, perforin and granzyme B mRNA was quantified by RT-qPCR. **D**, Human NK cells, cultured ( $\square$ ) or not with 1 ng/mL IL-12 ( $\blacksquare$ ), were stimulated or not for 48 h with 10 nM AEA. In some experiments, NK cells were stimulated with 400 U/mL IL-2 (grey histogram). Jurkat cells were cultured for 4 h with the cell culture supernatants of activated NK cells. The death of Jurkat cells was evaluated by quantifying LDH in the culture supernatants. Results are expressed as a percentage of cytotoxicity (mean  $\pm$  SD, n=4). **E**, Human NK cells were stimulated for 48 h with 1 ng/mL IL-12, in the absence or presence of 10 nM AEA or 2-AG. Activated NK cells were then cultured for 4 h with Jurkat cells, at the effector:target ratio of 10:1, without or with an anti-Fas or a control mAb. Cell death was evaluated by quantifying LDH in the culture supernatants. Results are expressed as a % of cytotoxicity (mean  $\pm$  SD, n=4). \*\*,  $p < 0.002$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ns, not significant. **F**, Human NK cells, cultured ( $\square$ ) or not with 1 ng/mL IL-12 ( $\blacksquare$ ), were stimulated or not for 48 h with 10 nM AEA. In some experiments, NK cells were stimulated with 50 ng/mL IL-12 plus 50 ng/mL IL-15 (grey histogram). The expression of CD107a was determined by FACS. Results are expressed in MFI values, after subtraction of the MFI obtained with the control mAb (mean  $\pm$  SD, n=5).

**Figure 4. Endocannabinoids activate NK cells via CB2.** **A**, The expression of the transcript encoding CB1, CB2, TRPV1 and GPR55 was analyzed by RT-qPCR in human NK cells and NK92 cells, not stimulated or stimulated with 50 ng/mL IL-12, 150 U/mL IL-2 or 50 ng/mL

IL-15. Results, expressed in relative mRNA expression, are representative of 1 of 3 experiments. **B**, Human NK cells were cultured or not for 48h with 1 ng/mL IL-12, without or with 10 nM AEA, in the absence or presence of 1  $\mu$ M SR144528 or SR144528. In some experiments, NK cells were stimulated with 400 U/mL IL-2 (grey histograms). IFN $\gamma$  was quantified by ELISA in the supernatants. Results are expressed in pg/mL (mean  $\pm$  SD, n=5). \*\*, p<0.01; \*, p<0.05 **C**, Human NK cells were stimulated or not with 1 ng/mL IL-12, without or with 10 nM AEA, and in the absence or presence of 1  $\mu$ M SR144528. As a positive control, NK cells were stimulated with 400 U/mL IL-2 (grey histograms). After 48 h, NK cells were cultured for 4 h with Jurkat cells, at the effector:target ratio of 10:1. Cell death was evaluated by quantifying LDH in the culture supernatants. Results, expressed as a percentage of cytotoxicity, are representative of 1 of 3 experiments.

**Figure 5. In vivo analysis of cytotoxic activity of NK stimulated with AEA.** **A**, Murine DX5<sup>+</sup> NK cells were stimulated with 0.5 ng/mL IL-12, without or with 10 nM AEA or 2-AG. IFN $\gamma$  was quantified by ELISA in the 48 h cell culture supernatants. Results are expressed in pg/mL (mean  $\pm$  SD, n = 3). \*, p<0.05. **B**, BALB/c mice (6-8 weeks of age) were implanted subcutaneously with CT26 cells in the right flank. At day 15, mice were injected intratumorally with NK cells stimulated with 0.5 ng/mL IL-12, without or with 10 nM AEA. Tumor volume was assessed daily. Results are expressed as a percentage of increase of tumor volume (mean  $\pm$  SD, n=5). \*, p<0.05.

Figure 1

Bouachour *et al*

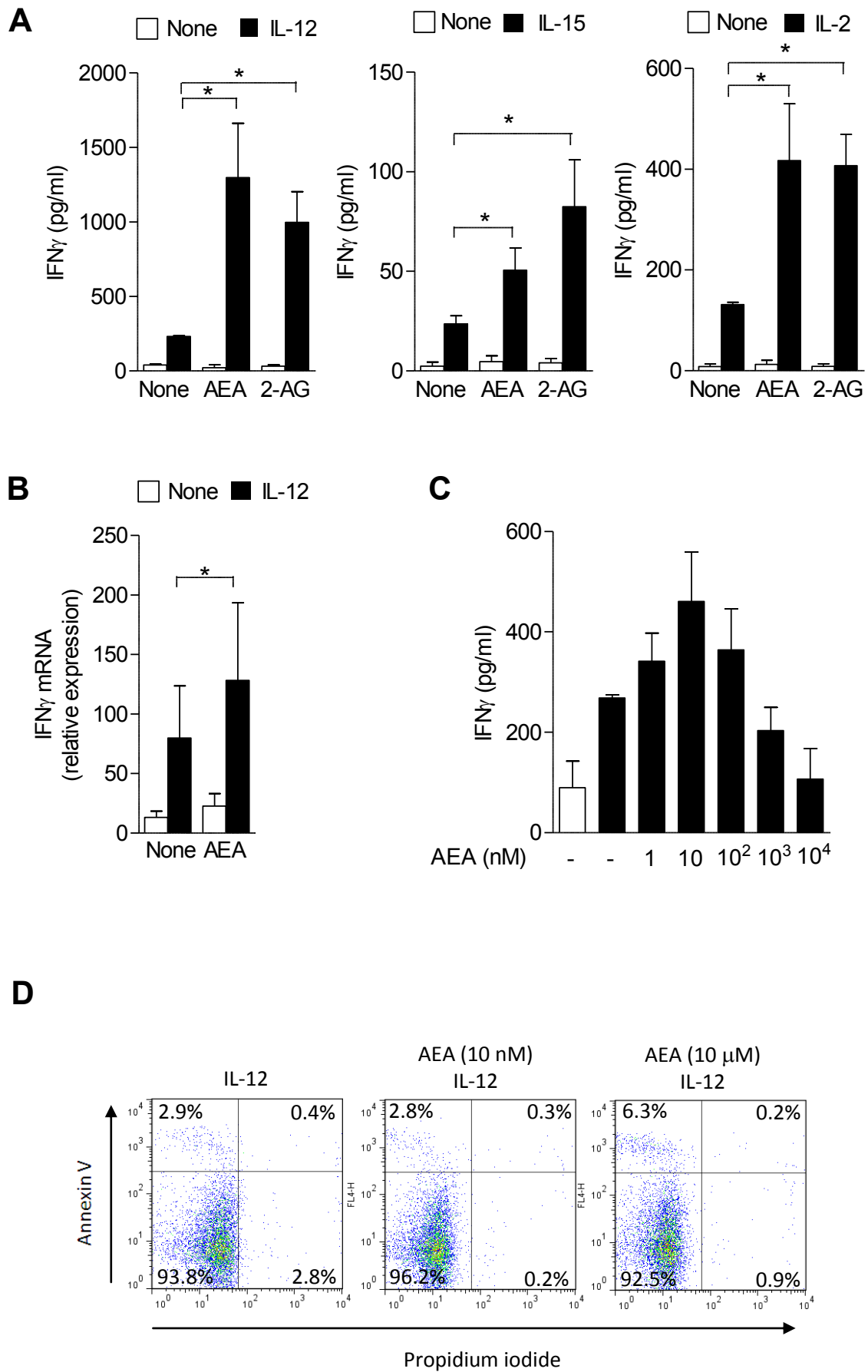


Figure 1 (suite)

Bouachour *et al*

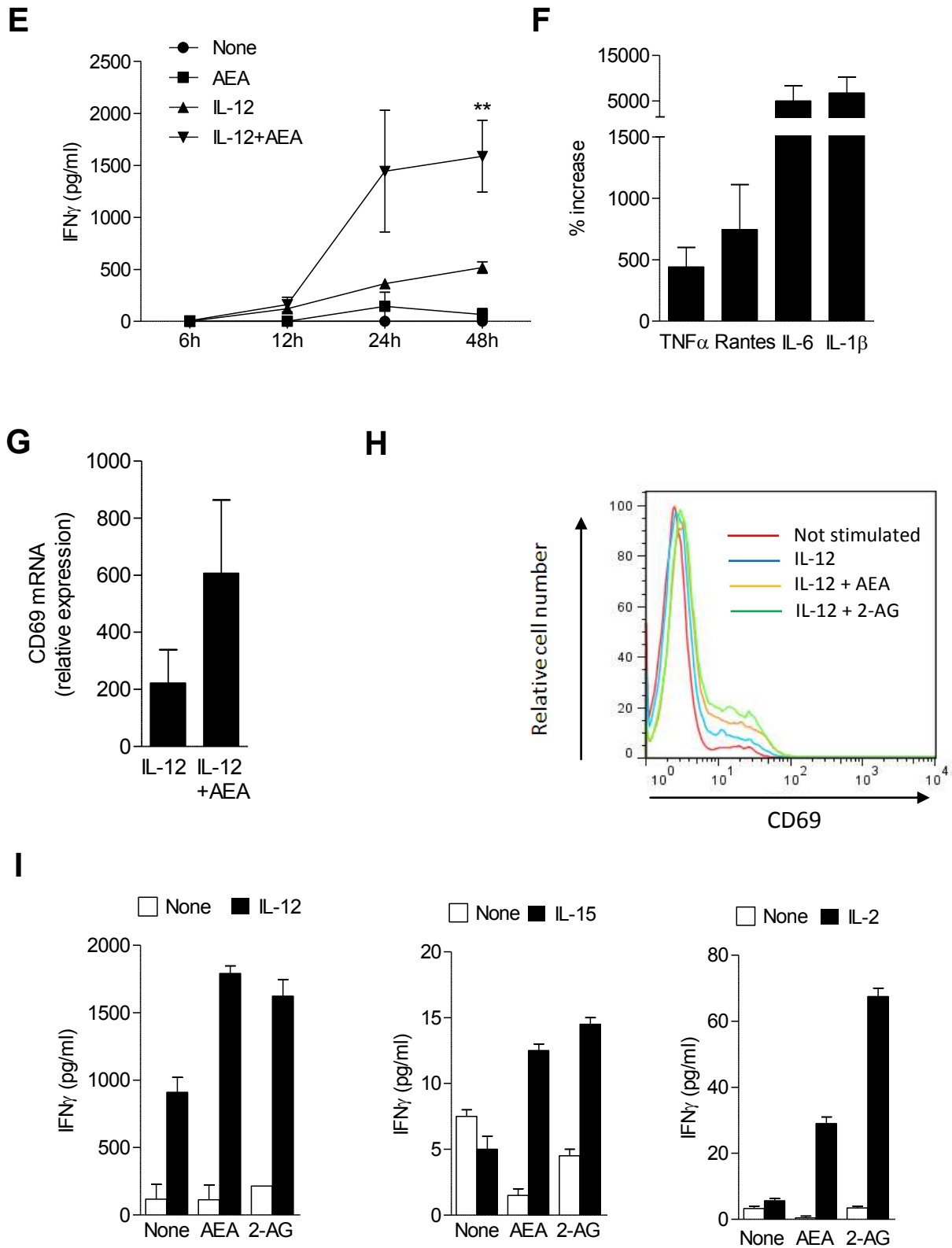
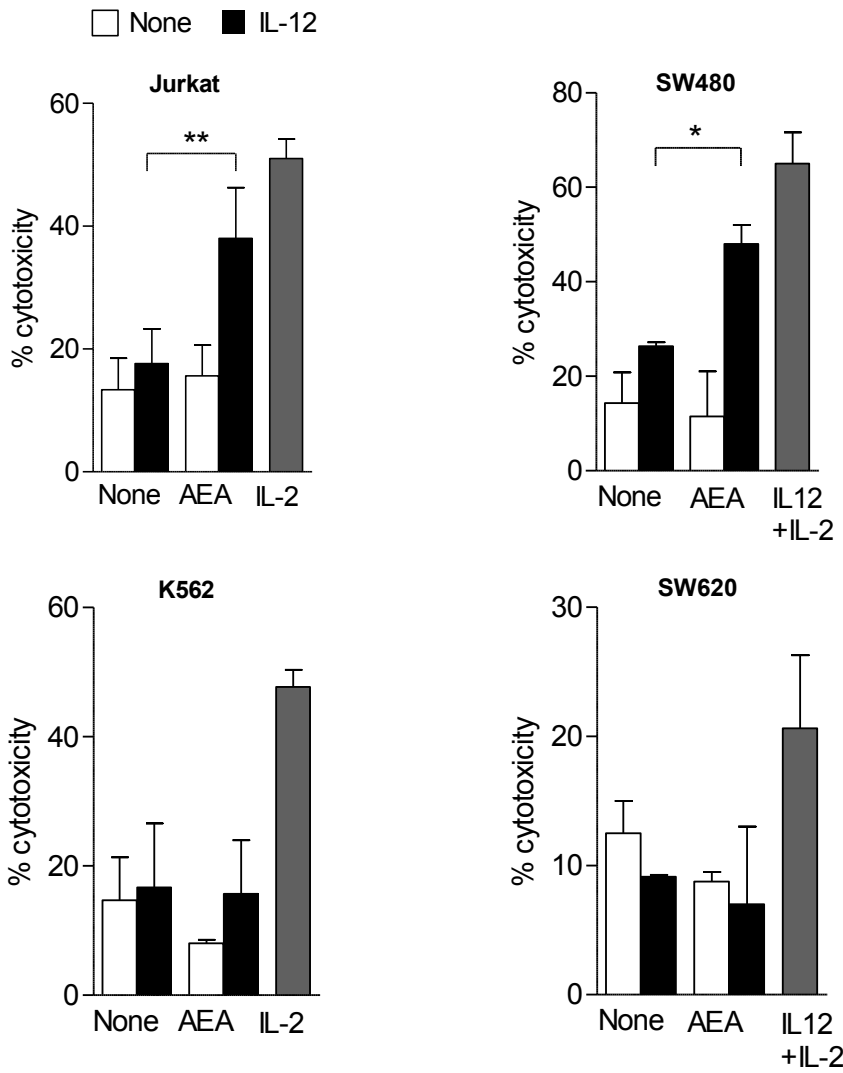


Figure 2

Bouachour *et al*

**A**



**B**

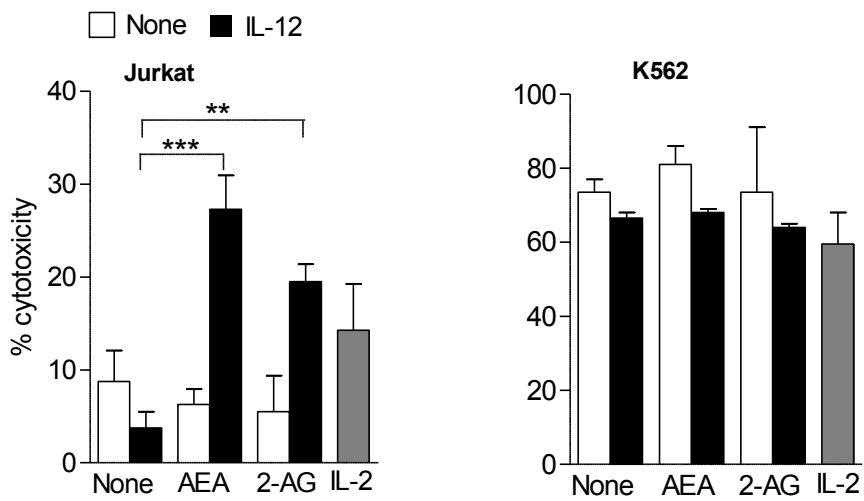
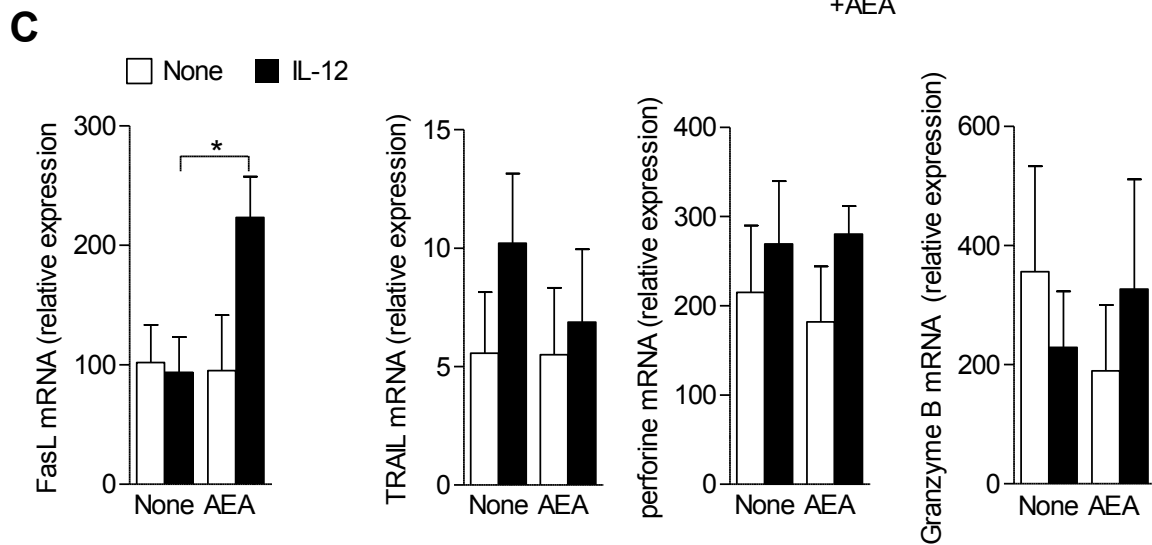
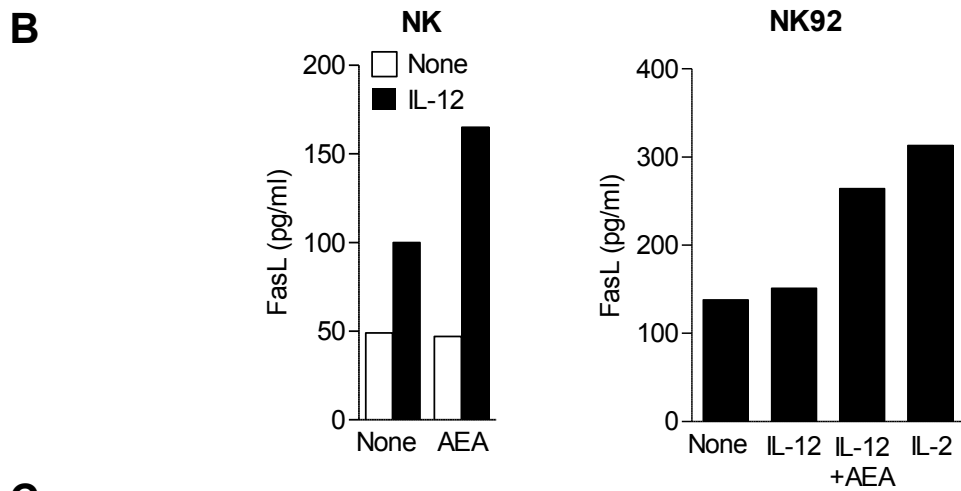
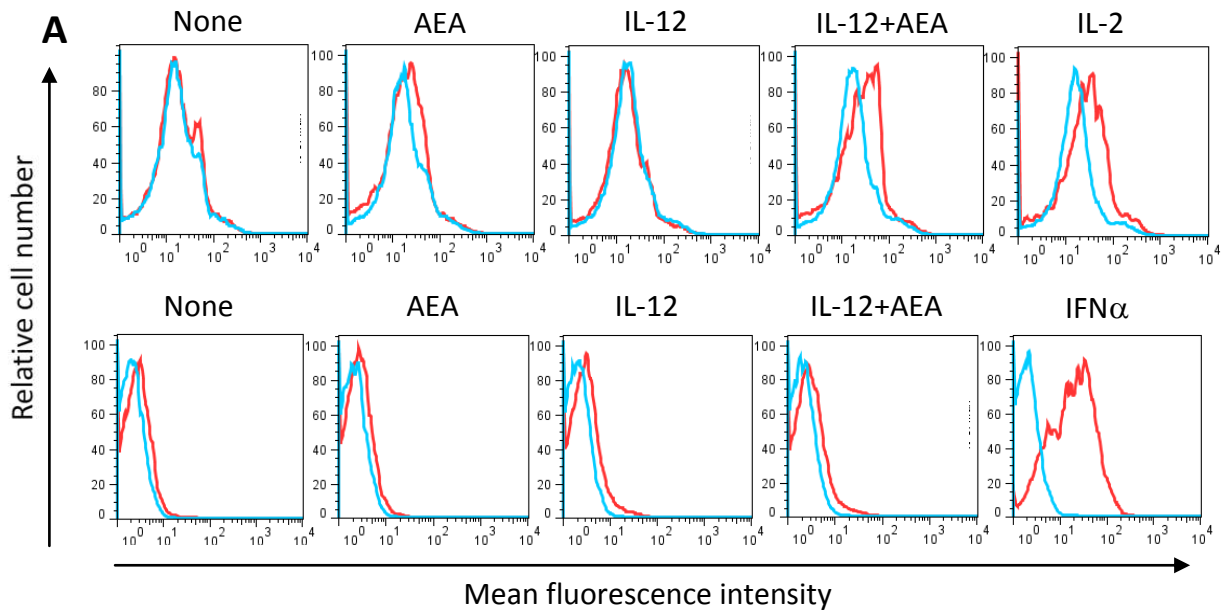


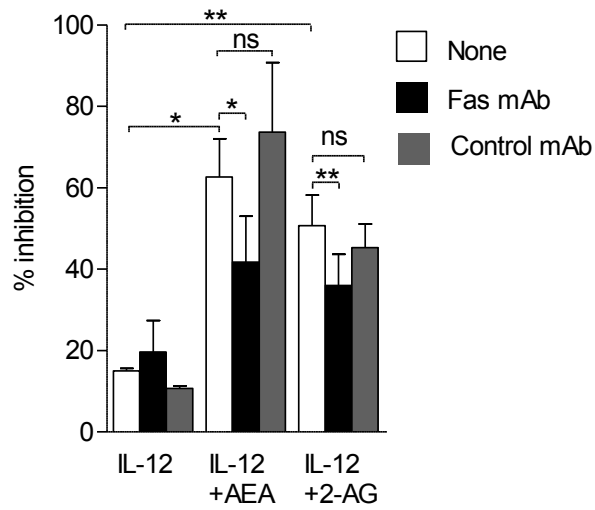


Figure 3

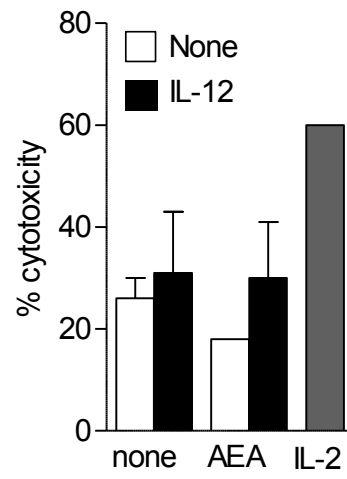
Bouachour *et al*



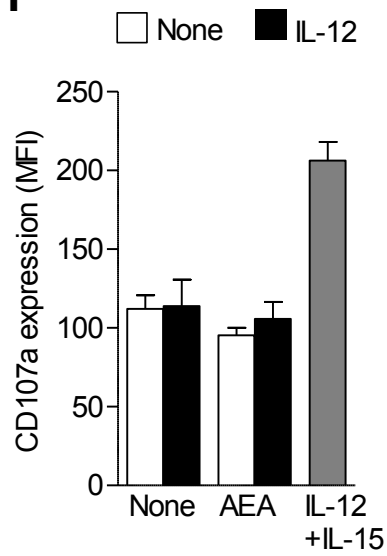
**D**



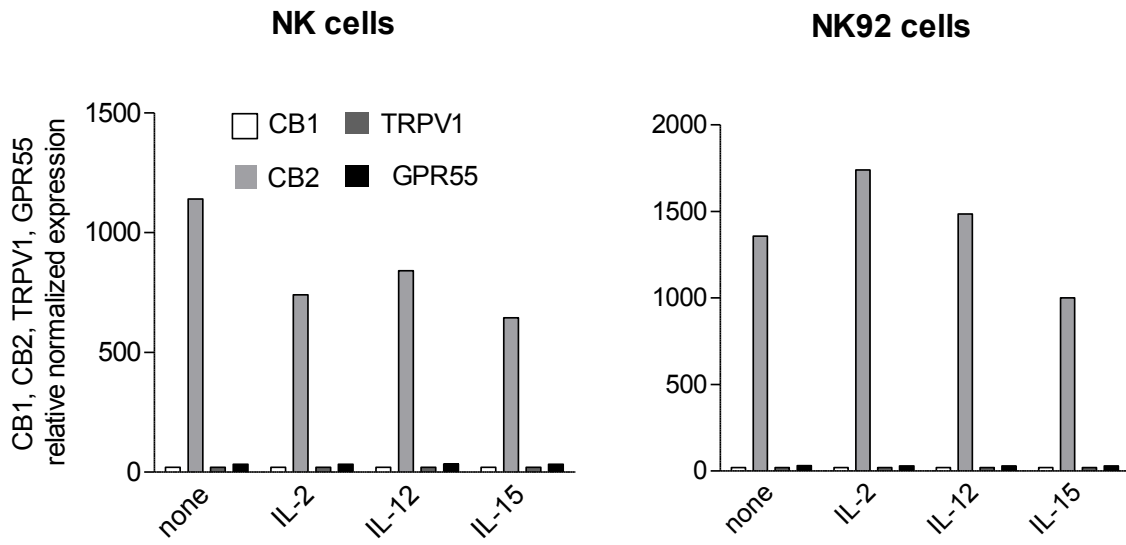
**E**



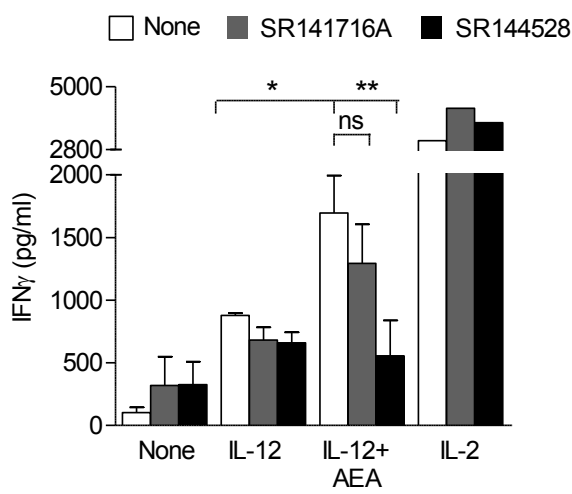
**F**



**A**



**B**



**C**

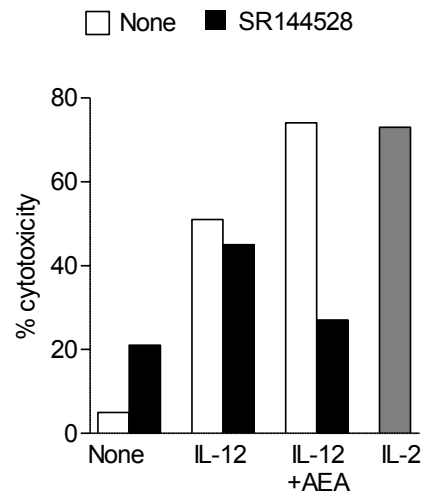
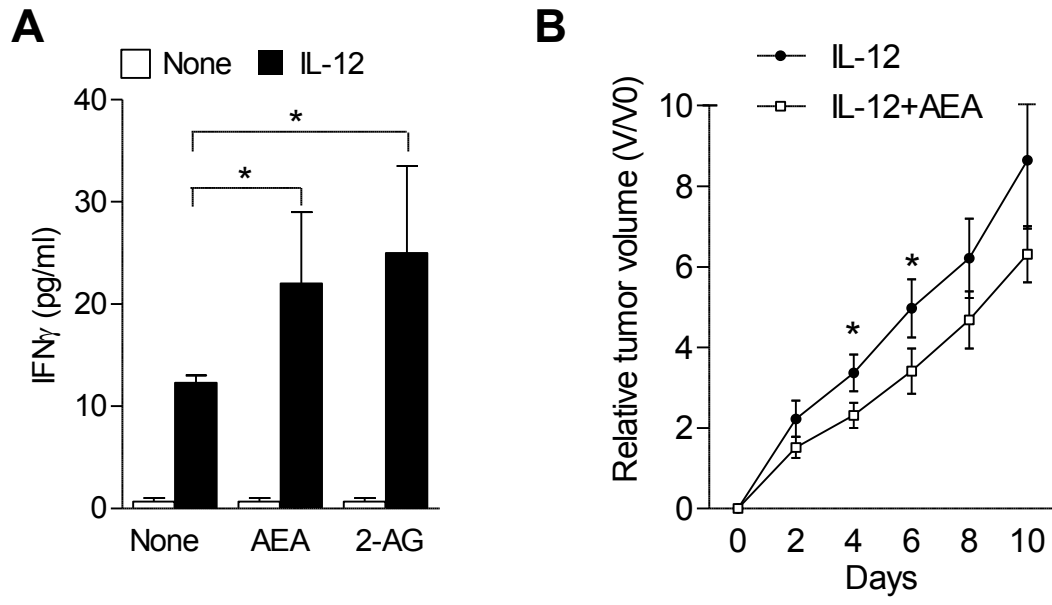
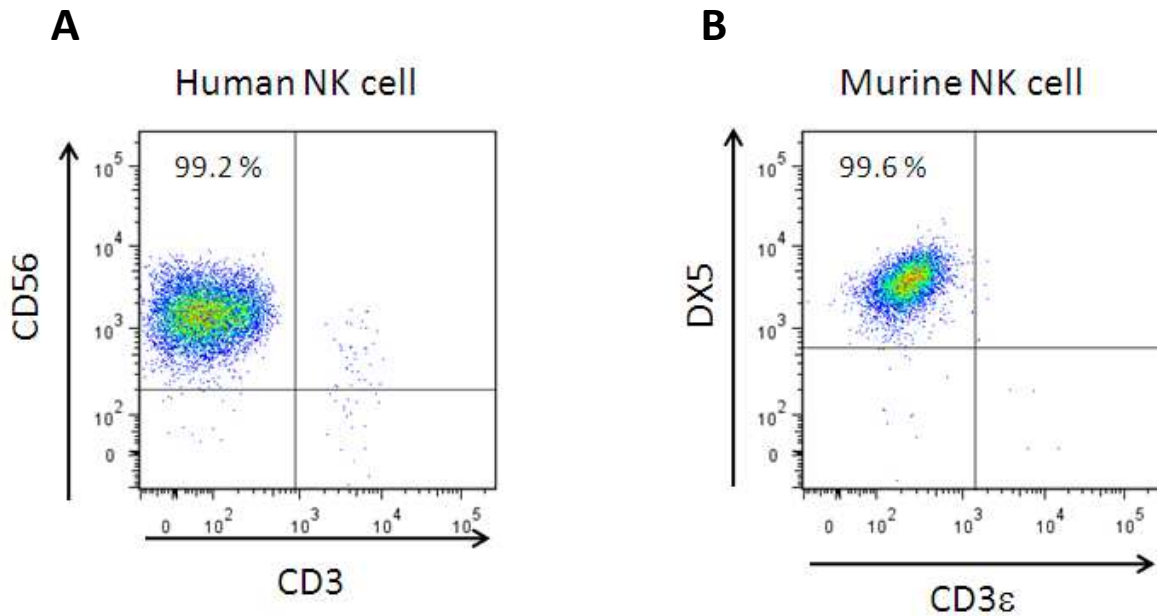


Figure 5

Bouachour *et al*





**Supplemental data Figure 1 : Purity of murine and human NK cells.** **A**, Murine NK cell were purified by negative selection using NK cell enrichment kit then sorted by positive selection using DX5 microbead. Purity was assessed by cytofluorometry used PE-labelled anti-DX5 and FITC-labeled anti-CD3e mAb. **B**, Human NK cell were purified by positive selection using CD56 microbeads then sorted by FACS. Purity was assessed by cytofluorometry using APC-labeled anti-CD56 mAb and FITC-labeled anti-+CD3 mAb.

## References

1. Di Marzo, V., et al., *Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons*. Nature, 1994. **372**(6507): p. 686-91.
2. Devane, W.A., et al., *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1946-9.
3. Mechoulam, R., et al., *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(1): p. 83-90.
4. Sugiura, T., et al., *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **215**(1): p. 89-97.
5. Matsuda, L.A., et al., *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature, 1990. **346**(6284): p. 561-4.
6. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature, 1993. **365**(6441): p. 61-5.
7. Freund, T.F., I. Katona, and D. Piomelli, *Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 1017-66.
8. Wu, H.M., Y.M. Yang, and S.G. Kim, *Rimonabant, a cannabinoid receptor type 1 inverse agonist, inhibits hepatocyte lipogenesis by activating liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase axis downstream of Galpha i/o inhibition*. Mol Pharmacol, 2011. **80**(5): p. 859-69.
9. Karvela, A., et al., *Endocannabinoid (EC) receptor, CB1, and EC enzymes' expression in primary adipocyte cultures of lean and obese pre-pubertal children in relation to adiponectin and insulin*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2010. **23**(10): p. 1011-24.
10. Howlett, A.C., et al., *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 161-202.
11. Viscomi, M.T., et al., *The endocannabinoid system: a new entry in remote cell death mechanisms*. Exp Neurol, 2010. **224**(1): p. 56-65.
12. Sharir, H. and M.E. Abood, *Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor*. Pharmacol Ther, 2010. **126**(3): p. 301-13.
13. Henstridge, C.M., *Off-target cannabinoid effects mediated by GPR55*. Pharmacology, 2012. **89**(3-4): p. 179-87.

14. Sharir, H., et al., *The Endocannabinoids Anandamide and Virodhamine Modulate the Activity of the Candidate Cannabinoid Receptor GPR55*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012.
15. El Manira, A. and A. Kyriakatos, *The role of endocannabinoid signaling in motor control*. Physiology (Bethesda), 2010. **25**(4): p. 230-8.
16. Berry, E.M. and R. Mechoulam, *Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite*. Pharmacol Ther, 2002. **95**(2): p. 185-90.
17. Taylor, A.H., et al., *Endocannabinoids and pregnancy*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(13-14): p. 921-30.
18. Tramer, M.R., et al., *Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review*. BMJ, 2001. **323**(7303): p. 16-21.
19. Guindon, J. and A.G. Hohmann, *The endocannabinoid system and pain*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2009. **8**(6): p. 403-21.
20. Jorda, M.A., et al., *Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2786-93.
21. Maestroni, G.J., *The endogenous cannabinoid 2-arachidonoyl glycerol as in vivo chemoattractant for dendritic cells and adjuvant for Th1 response to a soluble protein*. FASEB J, 2004. **18**(15): p. 1914-6.
22. Schwarz, H., F.J. Blanco, and M. Lotz, *Anadamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis*. J Neuroimmunol, 1994. **55**(1): p. 107-15.
23. Cencioni, M.T., et al., *Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8688.
24. Klein, T.W., et al., *Delta 9-tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to Legionella pneumophila infection*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6461-6.
25. Zhu, L.X., et al., *Delta-9-tetrahydrocannabinol inhibits antitumor immunity by a CB2 receptor-mediated, cytokine-dependent pathway*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 373-80.
26. Klein, T.W., *Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 400-11.

27. Killestein, J., et al., *Immunomodulatory effects of orally administered cannabinoids in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2003. **137**(1-2): p. 140-3.
28. Hart, S., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor*. Cancer Res, 2004. **64**(6): p. 1943-50.
29. Kishimoto, S., et al., *2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells*. J Biochem, 2004. **135**(4): p. 517-24.
30. Sugiura, T., et al., *New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: 2-arachidonoylglycerol as a possible novel mediator of inflammation*. J Pharmacol Sci, 2004. **96**(4): p. 367-75.
31. Cerwenka, A. and L.L. Lanier, *Natural killer cells, viruses and cancer*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 41-9.
32. Wallin, R.P., et al., *Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity*. Eur J Immunol, 2003. **33**(10): p. 2727-35.
33. Blery, M., et al., *Reconstituted killer cell inhibitory receptors for major histocompatibility complex class I molecules control mast cell activation induced via immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 8989-96.
34. Stanietsky, N. and O. Mandelboim, *Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity*. FEBS Lett, 2010. **584**(24): p. 4895-900.
35. Gracie, J.A., S.E. Robertson, and I.B. McInnes, *Interleukin-18*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 213-24.
36. Kuttler, F., et al., *Relationship between expression of genes involved in cell cycle control and apoptosis in diffuse large B cell lymphoma: a preferential survivin-cyclin B link*. Leukemia, 2002. **16**(4): p. 726-35.
37. Hayakawa, Y., et al., *IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide*. Blood, 2002. **100**(5): p. 1728-33.
38. Cooper, M.A., et al., *Cytokine-induced memory-like natural killer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1915-9.
39. Cella, M., et al., *A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity*. Nature, 2009. **457**(7230): p. 722-5.



40. Hellstrand, K. and S. Hermodsson, *An immunopharmacological analysis of adrenaline-induced suppression of human natural killer cell cytotoxicity*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1989. **89**(4): p. 334-41.
41. Hellstrand, K., S. Hermodsson, and O. Strannegard, *Evidence for a beta-adrenoceptor-mediated regulation of human natural killer cells*. J Immunol, 1985. **134**(6): p. 4095-9.
42. Bouaboula, M., et al., *Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes*. Eur J Biochem, 1993. **214**(1): p. 173-80.
43. Galiegue, S., et al., *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. Eur J Biochem, 1995. **232**(1): p. 54-61.
44. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
45. Daaka, Y., et al., *Induction of interleukin-2 receptor alpha gene by delta9-tetrahydrocannabinol is mediated by nuclear factor kappaB and CB1 cannabinoid receptor*. DNA Cell Biol, 1997. **16**(3): p. 301-9.
46. Kishimoto, S., et al., *Endogenous cannabinoid receptor ligand induces the migration of human natural killer cells*. J Biochem, 2005. **137**(2): p. 217-23.
47. Duluc, D., et al., *PolyI:C plus IL-2 or IL-12 induce IFN-gamma production by human NK cells via autocrine IFN-beta*. Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2877-84.
48. Bryceson, Y.T., et al., *A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes*. Blood, 2012. **119**(12): p. 2754-63.
49. Schumann, D.M., et al., *The Fas pathway is involved in pancreatic beta cell secretory function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(8): p. 2861-6.
50. Chi, K.H., et al., *Preclinical evaluation of locoregional delivery of radiolabeled iododeoxyuridine and thymidylate synthase inhibitor in a hepatoma model*. J Nucl Med, 2001. **42**(2): p. 345-51.
51. Zamai, L., et al., *Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2375-80.
52. Bergmann-Leitner, E.S. and S.I. Abrams, *Differential role of Fas/Fas ligand interactions in cytolysis of primary and metastatic colon carcinoma cell lines by human antigen-specific CD8+ CTL*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4941-54.

53. Huang, Y., et al., *Role of interleukin-18 in human natural killer cell is associated with interleukin-2*. Mol Immunol, 2010. **47**(16): p. 2604-10.
54. Tecchio, C., et al., *IFNalpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3837-44.
55. Toth, A., P.M. Blumberg, and J. Boczan, *Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1)*. Vitam Horm, 2009. **81**: p. 389-419.
56. Baldwin, G.C., et al., *Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(5): p. 1606-13.
57. Ribeiro, A., et al., *Anandamide prior to sensitization increases cell-mediated immunity in mice*. Int Immunopharmacol, 2010. **10**(4): p. 431-9.
58. Freud, A.G. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 56-72.
59. Zygmunt, P.M., et al., *Anandamide - the other side of the coin*. Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(2): p. 43-4.
60. Zoerner, A.A., et al., *Quantification of endocannabinoids in biological systems by chromatography and mass spectrometry: a comprehensive review from an analytical and biological perspective*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1811**(11): p. 706-23.
61. Carayon, P., et al., *Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3605-15.
62. Lauckner, J.E., et al., *GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(7): p. 2699-704.
63. Klein, T.W., et al., *The cannabinoid system and immune modulation*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 486-96.
64. Klein, T.W., C. Newton, and H. Friedman, *Inhibition of natural killer cell function by marijuana components*. J Toxicol Environ Health, 1987. **20**(4): p. 321-32.
65. Specter, S.C., et al., *Marijuana effects on immunity: suppression of human natural killer cell activity of delta-9-tetrahydrocannabinol*. Int J Immunopharmacol, 1986. **8**(7): p. 741-5.
66. Zhu, W., et al., *delta 9-Tetrahydrocannabinol (THC) causes the variable expression of IL2 receptor subunits*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **274**(2): p. 1001-7.

67. DeMorrow, S., et al., *Opposing actions of endocannabinoids on cholangiocarcinoma growth: recruitment of Fas and Fas ligand to lipid rafts*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 13098-113.
68. Monaco-Shawver, L., et al., *Substance P inhibits natural killer cell cytotoxicity through the neurokinin-1 receptor*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(1): p. 113-25.
69. Feistritzer, C., et al., *Effects of the neuropeptide secretoneurin on natural killer cell migration and cytokine release*. Regul Pept, 2005. **126**(3): p. 195-201.

## Discussion

Dans cette section, nous discuterons des interactions entre le système endocannabinoïde et le système immunitaire selon trois axes : (1) le rôle activateur des endocannabinoïdes sur les cellules NK, (2) l'implication des endocannabinoïdes dans l'immuno-régulation, et (3) la place de nos données dans le cadre de la réponse anti-tumorale et de leur application potentielle en thérapie anti-tumorale. Finalement, nous présenterons quelques perspectives à ce travail.

### 1. Endocannabinoïdes et cellules NK

Dans cette première partie seront discutés nos résultats sur les cellules NK. Trois principaux points seront abordés : (1) l'effet dose des endocannabinoïdes sur les cellules immunitaires, (2) les rôles du système endocannabinoïde sur la biologie des cellules NK, à savoir l'immuno-régulation, la cytotoxicité et le potentiel chimio-attractant, et (3) l'interaction de l'AEA et du 2-AG avec le récepteur CB2.

#### a. Importance de la concentration en endocannabinoïdes sur l'activation des cellules NK

Les deux principaux ligands endocannabinoïdes, l'AEA et le 2-AG, peuvent avoir des effets opposés selon qu'ils sont administrés à faibles ou à fortes doses. La majorité des études qui concernent les effets des ligands endocannabinoïdes sur les différents systèmes biologiques analysés, et plus particulièrement le système nerveux et le système immunitaire, mettent en évidence des rôles inhibiteurs.

Au niveau du système immunitaire, la majorité des études ont montré des rôles fortement inhibiteurs des ligands endocannabinoïdes lorsque la dose utilisée dépasse 1  $\mu\text{M}$ . Les premières études ont mis en évidence que fumer du cannabis a peu d'effet sur l'immunité systémique. En revanche, la fumée de cannabis est fortement immunosuppressive pour les cellules immunitaires directement en contact avec elle. La fumée de cannabis est associée à la suppression de l'activité antimicrobienne, de la production de cytokines et de la perte de réponse des macrophages alvéolaires aux signaux cytokiniques [248]. La prise chronique de

cannabis, qui peut se comparer à l'administration de fortes doses, entraîne une augmentation de l'incidence des infections ainsi que l'apparition de carcinome de la gorge [249-251].

L'AEA administré à des doses égales ou supérieures à 10  $\mu$ M entraîne une inhibition de la prolifération des lymphocytes T et B et induit leur apoptose [252]. Ces études, réalisées *in vitro*, ont été confirmées *in vivo* : l'administration de fortes doses de  $\Delta^9$ -THC (10 mg/kg tous les jours, pendant 4 jours) à des souris entraîne une nette diminution du nombre de cellules immunitaires dans la rate et le thymus. Cette chute du nombre de cellules correspond aux populations lymphocytaires T et B ainsi qu'aux macrophages [253]. En revanche, à faibles doses (de l'ordre du nano molaire *in vitro* ou inférieure ou égale à 0,1 mg/kg *in vivo*), les composés endocannabinoïdes ont des effets inverses. Ils présentent alors une activité immuno-stimulatrice, pro-inflammatoire, chimiotactique et favorisent l'initiation d'une réponse Th1 à médiation cellulaire. Le 2-AG est chimiotactique pour les cellules NK quand il est utilisé entre 10 nM et 1  $\mu$ M. De même, l'AEA, administré à faible dose (0,1 mg/kg), augmente l'immunité à médiation cellulaire *in vivo*.

Ces données de la littérature sont en adéquation avec nos résultats sur la capacité des endocannabinoïdes à activer les cellules NK lorsqu'ils sont utilisés à des doses faibles. Nous avons ainsi montré que la concentration de 10 nM d'AEA ou de 2-AG induit une potentialisation de la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de cellules tumorales, cette cytotoxicité étant essentiellement dépendante de la voie Fas/FasL. AEA et 2-AG augmentent également la production d'IFN $\gamma$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, de TNF $\alpha$  et de RANTES, et induisent une augmentation de l'expression du marqueur d'activation CD69. Par contre, des doses supérieures à 1  $\mu$ M n'ont pas d'effet sur la production d'IFN $\gamma$  ni sur l'activité cytotoxique.

Il est intéressant de noter que, dans la littérature, l'utilisation de doses d'endocannabinoïdes supérieures à 1-10  $\mu$ M est responsable de l'apoptose des lymphocytes T et des lymphocytes B. Cependant, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de mortalité des cellules NK activées avec des doses supérieures à 1  $\mu$ M d'endocannabinoïdes. A ce stade, nous n'avons pas d'explication sur cette différence de sensibilité aux endocannabinoïdes entre lymphocytes T et B et cellules NK. Deux hypothèses peuvent être avancées : une désensibilisation du récepteur CB2 à des doses élevées de ligands et/ou une diminution d'expression du récepteur CB2 (consécutives ou non à un recyclage accéléré) sur les cellules NK. Des expériences sont en cours pour évaluer ce point.

## b. Effet des endocannabinoïdes sur la biologie des cellules NK

Les cellules NK ont deux fonctions principales, une activité cytotoxique et une activité immuno-régulatrice [1]. Peu d'études ont été réalisées pour décrire l'effet des endocannabinoïdes sur la biologie des cellules NK, les quelques données existantes décrivant un effet inhibiteur du  $\Delta^9$ -THC sur l'expression constitutive des cytokines et des chimiokines, telles que IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, TNF $\alpha$  ou IFN $\gamma$ . Ces mêmes études ont montré un rôle inhibiteur du  $\Delta^9$ -THC sur l'activité cytotoxique des cellules NK [220, 221]. Cependant, toutes ces études ont été réalisées en utilisant des ligands non endogènes et utilisés à fortes doses. De plus, la plupart de ces études ont été réalisés chez le rat ou la souris en injectant des doses supérieures ou égales à 3 mg/kg et lorsque les expériences ont été faites *in vitro*, les doses utilisées étaient de 20  $\mu$ M [220, 221, 254].

Les cellules NK exercent leur activité cytotoxique *via* deux mécanismes : soit par dégranulation d'enzymes lytiques qui vont perforer la membrane plasmique des cellules cibles pour ensuite activer des voies de signalisation pro-apoptotiques, soit par contact direct avec la cellule cible. La lyse à distance se fait par la libération de molécules comme perforine ou granzyme B, présentes dans des granules de sécrétion. La lyse par contact cellulaire fait intervenir des récepteurs de mort cellulaire appartenant à la famille du TNF. Dans cette famille se retrouvent les récepteurs TNF $\alpha$ , TRAIL, FasL, ainsi que les lymphotoxines  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans notre étude, nous avons montré que les endocannabinoïdes potentialisent la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des lignées Jurkat et SW480 alors que les lignées K562 et SW620 sont insensibles à la lyse par les cellules NK activées par les endocannabinoïdes. Il est intéressant de noter que les lignées Jurkat et SW480 sont sensibles à la lyse par FasL, alors que les lignées K562 ou SW620 sont insensibles à la lyse par FasL [255, 256]. La lignée K562 peut être lysée par TRAIL [257] mais pas la lignée SW620 [258]. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet des endocannabinoïdes sur l'expression de FasL et de TRAIL par les cellules NK. L'expression de FasL par les cellules NK est augmentée après stimulation par les endocannabinoïdes AEA et 2-AG. La capacité des endocannabinoïdes à moduler l'expression de la molécule FasL a été rapportée dans un modèle de cholangiocarcinome. L'AEA, mais pas le 2-AG, induit une augmentation de l'expression des molécules Fas et FasL au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique des cellules [262].

En revanche, aucune modulation d'expression de TRAIL n'a été observée sur les cellules NK suite à la stimulation par les ligands AEA et 2-AG. L'absence d'implication des molécules lytiques, granzyme et perforine, dans la lyse des cellules tumorales a été confirmée par le fait que les cellules NK, en contact avec les lignées Jurkat ou SW480, ne dégranulent pas en réponse aux endocannabinoïdes. En ce qui concerne l'expression de TRAIL, les données de la littérature montrent que, à l'exception notable des IFN de type 1, la majorité des molécules qui activent les cellules NK, et en particulier les cytokines IL-2, IL-12 et IL-15, diminuent l'expression de TRAIL à la surface des cellules NK [259-261]. A noter que les mécanismes impliqués dans l'expression différentielle de FasL et de TRAIL par les cellules NK sont mal connus.

L'activité immuno-régulatrice des cellules NK consiste principalement en la sécrétion de cytokines et de chimiokines qui vont permettre de sensibiliser et de moduler l'activation des autres cellules environnantes, et en particulier les cellules du système immunitaire. Nous avons mis en évidence que les endocannabinoïdes AEA et 2-AG potentialisent la production et la sécrétion des cytokines IFN $\gamma$ , IL- $\beta$  et TNF $\alpha$  et de la chimiokine RANTES. Ces résultats contrastent avec les données de la littérature sur le rôle des ligands endocannabinoïdes sur la production des cytokines et chimiokines utilisés à fortes doses (supérieures à 1  $\mu$ M).

Une étude réalisée par Kishimoto *et al* indique que le 2-AG a une activité chimiotactique sur les cellules NK. Ce rôle du ligand endocannabinoïde 2-AG dépend de CB2. L'AEA utilisé à 1  $\mu$ M n'a pas d'effet sur le chimiotactisme des cellules NK [222]. Sur la base de nos observations et des données de la littérature, il est probable, comme cela a été observé pour la production de cytokines et l'activité cytotoxique, que l'effet chimiotactique des ligands endocannabinoïdes soit dépendant des concentrations utilisées et que les doses utilisées dans les études précitées ne soient pas adaptées pour observer un effet régulateur sur le chimiotactisme de ces cellules. Une autre étude indique que, *in vivo*, le 2-AG, utilisé à faible dose (10 nM), garde son potentiel chimiotactique sur les cellules NK mais également sur les cellules dendritiques. Cet effet du 2-AG sur le recrutement des cellules immunitaires est également observé sur les lignées de cellules myéloïdes. Finalement, plusieurs études ont montré que le 2-AG augmente la production de chimiokines, telles que l'IL-8 ou MCP-1 par la lignée HL-60 [211, 263].

### c. Les interactions des ligands AEA et 2-AG avec le récepteur CB2

Dans le système endocannabinoïde sont présents plusieurs récepteurs, dont les deux principaux sont CB1 et CB2. CB1 est surtout exprimé dans le système nerveux tandis que CB2 est principalement exprimé par les cellules du système immunitaire. La majorité des effets qu'exercent les endocannabinoïdes sur les cellules du système immunitaire sont médiés par le récepteur CB2. L'AEA et le 2-AG sont les ligands naturels de CB2, le 2-AG étant plus afin pour CB2 que l'AEA [107].

CB2 est impliqué dans la modulation de la migration, la prolifération, l'apoptose et la production de cytokines par les cellules immunitaires [118, 192].

Le rôle chimiotactique du 2-AG sur les cellules myéloïdes et les cellules NK est dépendant de CB2. Le fait que l'AEA n'ait pas d'effet sur la migration des cellules du système immunitaire, contrairement au 2-AG, peut s'expliquer par la différence d'affinité de ces deux ligands avec le récepteur CB2.

La quantification des ARNm codant les récepteurs CB1, TRPV1 et GPR55, avec ou sans stimulation préalable des cellules NK avec les cytokines activatrices IL-2, IL-12 ou IL-15, a confirmé l'absence d'expression de ces récepteurs par les cellules NK. En revanche, comme décrit dans la littérature, le récepteur CB2 est fortement exprimé par les cellules NK [191]. L'expression des récepteurs endocannabinoïdes, et plus particulièrement de CB2, par les cellules immunitaires, peut être modulée en réponse à divers stimuli. Bien que cette modulation diffère d'un type cellulaire à un autre, nous n'avons pas observé de modulation de l'expression de CB2 en réponse à l'IL-2, l'IL-12 ou l'IL-15, quelque soit la dose utilisée.

La majorité des études [107, 128, 129, 199] ont rapporté un rôle inhibiteur de CB2 sur la production de cytokines par les cellules immunitaires lorsque ses ligands sont utilisés à de fortes doses. Par exemple, l'immunosuppression des lymphocytes T activés induite par une forte dose d'AEA (10  $\mu$ M) est dépendante de CB2 et se traduit par une inhibition de la production de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  [264]. Nous avons montré que l'effet potentialisateur des ligands AEA et 2-AG, utilisés à faible dose, sur la production d'IFN $\gamma$  et sur la cytotoxicité vis-à-vis de cellules tumorales, est dépendante du récepteur CB2. Ce rôle potentialisateur des endocannabinoïdes est inhibé en présence de l'antagoniste de CB2, SR144528. En revanche, l'antagoniste de CB1 (SR141716A) ne module pas la production d'IFN $\gamma$  induite par l'AEA ou le 2-AG, confirmant que CB1 n'a pas de rôle dans la transmission du signal. SR141716A est



également un antagoniste du récepteur GPR55, confirmant que GPR55 n'est pas impliqué dans l'activation des cellules NK par les endocannabinoïdes.

Malgré une expression très faible de CB1 par rapport à CB2, CB1 n'est pas totalement absent du système immunitaire et certains effets des endocannabinoïdes ont été rapportés comme médiés par CB1. Par exemple, l'AEA, ainsi que le THC, induisent l'apoptose des cellules dendritiques *via* CB2 mais également par CB1 [218]. Cela démontre que, même si CB2 est le récepteur majoritaire dans le système immunitaire, CB1 peut également jouer un rôle dans la régulation des cellules qui l'expriment.

## 2. Endocannabinoïdes et immuno-régulation

Le système endocannabinoïde participe à la régulation du système immunitaire. Ainsi, le 2-AG participe à la mobilité des cellules myéloïdes et des cellules NK. *In vivo*, le 2-AG a des propriétés chimiotactiques [222, 263]. Utilisé comme adjuvant, il favorise la primo-immunisation en combinaison avec une protéine soluble chez la souris. Il permet l'induction d'une réponse Th1 en augmentant le nombre de cellules dendritiques qui migrent au site de d'injection de l'Ag. Le 2-AG est le principal médiateur des effets induits par les ligands endocannabinoïdes sur les cellules immunitaires.

L'AEA participe également à la régulation de la réponse immunitaire. Il favorise la prolifération des splénocytes et augmente la concentration d'IFN $\gamma$  systémique. En revanche, il n'y a pas de modulation de la concentration d'IL-4 (signature d'une réponse Th2) en réponse à l'AEA [206].

Dans notre étude, nous avons utilisé des doses faibles d'AEA et de 2-AG. Les activités biologiques ainsi obtenues, avec des doses d'endocannabinoïdes compatibles avec celles qui sont retrouvées *in vivo*, sont proches de la situation physiologique. Les concentrations d'AEA et de 2-AG varient en fonction du type de tissus et se situent entre 1 et 100 nM chez l'homme [265, 266]. L'effet chimiotactique du 2-AG est décrit à partir de 10 nM et nous avons montré qu'une concentration équivalente active les cellules NK. Notre étude apporte donc des informations complémentaires sur les propriétés immuno-régulatrices des endocannabinoïdes.

### 3. Endocannabinoïdes et thérapie anti-tumorale

Il est aujourd'hui admis que les phytocannabinoïdes (composés exogènes), dérivés de la plante *Cannabis sativa*, ont une action bénéfique sur les effets secondaires des chimiothérapies et radiothérapies. Des études précliniques et cliniques sur les applications possibles des cannabinoïdes comme agents anti-cancéreux sont actuellement en cours (liste non exhaustive des essais cliniques ; <http://www.clinicaltrials.gov/>) :

- Essai sur l'efficacité du Tétrahydrocannabinol oral pour les patients atteints de fibromyalgie, à l'Hadassah Medical Organization, Jérusalem, Israël.
- Évaluation de l'efficacité et de la sûreté du Nabilone comme thérapie associative de la Gabapentine dans le traitement de la douleur de la sclérose en plaques, à l'université de Manitoba, Winnipeg, Canada.
- Une étude sur le sativex pour soulager les douleurs persistantes des patients atteints d'un cancer de stade avancé, aux États-Unis, au Royaume-Uni et en Allemagne.
- Effets de la marijuana vaporisée dans le traitement de la douleur neuropathique au CTSC Clinical Research Center, Sacramento VA Medical Center Sacramento, Californie, États-Unis.

Nous avons montré que les endocannabinoïdes (composés endogènes) présentent également un potentiel anticancéreux indirect en potentialisant l'activité anti-tumorale des cellules NK. Nous avons confirmé *in vivo* les résultats obtenus *in vitro* sur la potentialisation de l'activité cytotoxique des cellules NK stimulées avec AEA. En effet, nous avons observé qu'une injection unique de cellules NK murines activées *ex-vivo* par l'AEA en intra-tumoral induit un ralentissement significatif de la croissance d'une lignée tumorale sensible à la lyse par FasL. Dans le cadre d'une thérapie ciblée, où le préalable à tout traitement est la caractérisation génotypique et phénotypique la plus précise possible de la tumeur, l'étude de l'expression des différents récepteurs endocannabinoïdes et des récepteurs de mort de la famille du TNF pourrait permettre d'appliquer une thérapie à façon. Par exemple, si une tumeur exprime peu ou pas les récepteurs CB1 et CB2 mais se révèle sensible à la lyse par FasL, l'activation *ex-vivo* de cellules NK du patient puis réinjectées en intra-tumoral, pourrait constituer une nouvelle forme de thérapie cellulaire. A l'inverse, si une tumeur exprime constitutivement les récepteurs CB1 et CB2 à des niveaux très élevés, on peut imaginer que favoriser la production

endogène des ligands endocannabinoïdes par une action sur les enzymes impliquées dans les voies de synthèse et/ou en inhibant les enzymes responsables de leur dégradation, pourrait constituer une thérapie innovante dans le traitement des cancers.

#### 4. Perspectives

Afin de poursuivre ce travail, nous avons envisagé plusieurs perspectives.

Nous avons commencé à donner une suite à ce travail en étudiant l'effet des endocannabinoïdes sur la cytotoxicité cellulaire dépendante d'un anticorps (ADCC). En effet, les cellules NK peuvent exercer une activité lytique *via* le mécanisme de l'ADCC. Les résultats préliminaires montrent que des cellules NK stimulées avec AEA ou 2-AG augmentent la lyse dépendante du cétuximab de cellules tumorales de lignées colorectales exprimant l'EGFR (epidermal growth factor receptor). Pour tenter d'expliquer cette augmentation, nous évaluerons l'effet des endocannabinoïdes sur l'expression du CD16 par les cellules NK. Nous regarderons également si les endocannabinoïdes ont un effet sur l'expression des molécules exprimées par les cellules cancéreuses utilisées classiquement comme cibles dans les traitements anti-cancéreux, comme par exemple l'EGFR qui est ciblé par le cétuximab.

D'autres pistes de travail sont aussi envisagées. Notre étude portait sur les analogues cannabinoïdes endogènes. Il serait intéressant d'étudier les effets des analogues exogènes, les phytocannabinoïdes, utilisés à faibles doses sur l'activation des cellules NK *in vitro*, et plus généralement, étudier leurs effets sur les cellules de l'immunité innée.

Nous avons également montré le potentiel anti-tumoral indirect des ligands endocannabinoïdes *via* l'activation des cellules NK. Nous pourrions alors étudier l'effet de faibles concentrations d'endocannabinoïdes sur les cellules cancéreuses *versus* de fortes concentrations : évaluer leur cytotoxicité directe ou non ainsi que la modulation de l'expression des récepteurs endocannabinoïdes et/ou des récepteurs de la famille du TNF.

Nous avons observé que les endocannabinoïdes potentialisent l'activation des cellules NK et en particulier leur fonctions cytotoxiques. Il serait donc intéressant d'évaluer le rôle des endocannabinoïdes sur la génération et l'activité cytotoxique des lymphocytes T cytotoxiques générés dans le cadre d'une vaccination anti-tumorale.

## Références :

1. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and clinical relevance of human natural killer cells*. Blood, 1990. **76**(12): p. 2421-38.
2. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3146-51.
3. Caligiuri, M.A., et al., *Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1509-26.
4. Baume, D.M., et al., *Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells*. Eur J Immunol, 1992. **22**(1): p. 1-6.
5. Lanier, L.L., et al., *The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes*. J Immunol, 1986. **136**(12): p. 4480-6.
6. Ikebe, M., et al., *Lymphohaematopoietic abnormalities and systemic lymphoproliferative disorder in interleukin-2 receptor gamma chain-deficient mice*. Int J Exp Pathol, 1997. **78**(3): p. 133-48.
7. Freud, A.G. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 56-72.
8. Freud, A.G., et al., *A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 295-304.
9. Andrews, D.M. and M.J. Smyth, *A potential role for RAG-1 in NK cell development revealed by analysis of NK cells during ontogeny*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(2): p. 107-16.
10. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
11. Vilches, C. and P. Parham, *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 217-51.
12. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-9.
13. Middleton, D., M. Curran, and L. Maxwell, *Natural killer cells and their receptors*. Transpl Immunol, 2002. **10**(2-3): p. 147-64.
14. MacFarlane, A.W.t. and K.S. Campbell, *Signal transduction in natural killer cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **298**: p. 23-57.

15. Campbell, K.S. and A.K. Purdy, *Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations*. Immunology, 2011. **132**(3): p. 315-25.
16. Biassoni, R., et al., *The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 645-50.
17. Borges, L., et al., *A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules*. J Immunol, 1997. **159**(11): p. 5192-6.
18. Colonna, M., et al., *A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(3): p. 375-81.
19. Fanger, N.A., et al., *The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes*. Eur J Immunol, 1998. **28**(11): p. 3423-34.
20. Meyaard, L., et al., *LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes*. Immunity, 1997. **7**(2): p. 283-90.
21. Olde Nordkamp, M.J., et al., *Enhanced secretion of leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2 (LAIR-2) and soluble LAIR-1 in rheumatoid arthritis: LAIR-2 is a more efficient antagonist of the LAIR-1-collagen inhibitory interaction than is soluble LAIR-1*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(12): p. 3749-57.
22. Takei, F., J. Brennan, and D.L. Mager, *The Ly-49 family: genes, proteins and recognition of class I MHC*. Immunol Rev, 1997. **155**: p. 67-77.
23. Berg, S.F., et al., *Two genes in the rat homologous to human NKG2*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 444-50.
24. Hanke, T., et al., *Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 67-77.
25. Westgaard, I.H., et al., *Identification of a human member of the Ly-49 multigene family*. Eur J Immunol, 1998. **28**(6): p. 1839-46.
26. Vance, R.E., et al., *Cloning of a mouse homolog of CD94 extends the family of C-type lectins on murine natural killer cells*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3236-41.
27. Ho, E.L., et al., *Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6320-5.

28. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
29. Wu, J., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10*. Science, 1999. **285**(5428): p. 730-2.
30. Davis, K.P., et al., *Invasive vaginal carcinoma: analysis of early-stage disease*. Gynecol Oncol, 1991. **42**(2): p. 131-6.
31. Diefenbach, A., et al., *Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 119-26.
32. Cosman, D., et al., *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 123-33.
33. Bahram, S., et al., *A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6259-63.
34. Stephens, H.A., *MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?* Trends Immunol, 2001. **22**(7): p. 378-85.
35. Borrego, F., J. Pena, and R. Solana, *Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases*. Eur J Immunol, 1993. **23**(5): p. 1039-43.
36. Moretta, A., et al., *CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1393-8.
37. Bohmer, T., *[Occurrence of complications and/or malpractice after diagnosis and treatment in hospital]*. Tidsskr Nor Laegeforen, 1977. **97**(22): p. 1102-7, 1101.
38. Moretta, L., et al., *Allorecognition by NK cells: nonself or no self?* Immunol Today, 1992. **13**(8): p. 300-6.
39. Blery, M., et al., *Reconstituted killer cell inhibitory receptors for major histocompatibility complex class I molecules control mast cell activation induced via immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 8989-96.
40. Kagi, D., et al., *Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity*. Science, 1994. **265**(5171): p. 528-30.

41. Henkart, P.A., *Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules*. Immunity, 1994. **1**(5): p. 343-6.
42. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 361-70.
43. Hudig, D., et al., *Lymphocyte granule-mediated cytolysis requires serine protease activity*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **149**(3): p. 882-8.
44. Edwards, K.M., et al., *The human cytotoxic T cell granule serine protease granzyme H has chymotrypsin-like (chymase) activity and is taken up into cytoplasmic vesicles reminiscent of granzyme B-containing endosomes*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30468-73.
45. Fellows, E., et al., *Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program*. Blood, 2007. **110**(2): p. 544-52.
46. Smyth, M.J., et al., *Met-ase: cloning and distinct chromosomal location of a serine protease preferentially expressed in human natural killer cells*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6195-205.
47. Nakajima, H., H.L. Park, and P.A. Henkart, *Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin*. J Exp Med, 1995. **181**(3): p. 1037-46.
48. Froelich, C.J., et al., *New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29073-9.
49. Browne, K.A., et al., *Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8604-15.
50. Young, J.D., et al., *Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity*. Cell, 1986. **44**(6): p. 849-59.
51. Raja, S.M., et al., *Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49523-30.
52. Catalfamo, M. and P.A. Henkart, *Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(5): p. 522-7.

53. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1449-56.
54. Schulze-Osthoff, K., et al., *Apoptosis signaling by death receptors*. Eur J Biochem, 1998. **254**(3): p. 439-59.
55. Suda, T., et al., *Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 3806-13.
56. Oshimi, Y., et al., *Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2909-15.
57. Griffith, T.S., et al., *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1189-92.
58. Ehrlich, S., et al., *Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes*. Cytokine, 2003. **24**(6): p. 244-53.
59. Halaas, O., et al., *Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages*. Scand J Immunol, 2000. **51**(3): p. 244-50.
60. Fanger, N.A., et al., *Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*. J Exp Med, 1999. **190**(8): p. 1155-64.
61. Griffith, T.S., et al., *Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1343-54.
62. Walczak, H. and T.L. Haas, *Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex*. Methods Mol Biol, 2008. **414**: p. 221-39.
63. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
64. Pitti, R.M., et al., *Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 12687-90.
65. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
66. Krammer, P.H., *The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system*. Toxicol Lett, 1998. **102-103**: p. 131-7.
67. Alnemri, E.S., et al., *Human ICE/CED-3 protease nomenclature*. Cell, 1996. **87**(2): p. 171.
68. Muzio, M., et al., *FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex*. Cell, 1996. **85**(6): p. 817-27.



69. Chinnaiyan, A.M., et al., *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. Cell, 1995. **81**(4): p. 505-12.
70. Siberil, S., et al., *Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences*. Immunol Lett, 2006. **106**(2): p. 111-8.
71. Gessner, J.E., et al., *The IgG Fc receptor family*. Ann Hematol, 1998. **76**(6): p. 231-48.
72. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
73. Nagler, A., L.L. Lanier, and J.H. Phillips, *Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo*. J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1527-33.
74. Cooper, M.A., et al., *Interleukin-1β costimulates interferon-γ production by human natural killer cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 792-801.
75. Kunikata, T., et al., *Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody*. Cell Immunol, 1998. **189**(2): p. 135-43.
76. Carson, W.E., et al., *The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells*. Blood, 1995. **85**(12): p. 3577-85.
77. Jaeggi, A., R.P. Zurbrugg, and C. Aebi, *Complications of varicella in a defined central European population*. Arch Dis Child, 1998. **79**(6): p. 472-7.
78. Peritt, D., et al., *Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 5821-4.
79. Campbell, J.J., et al., *Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6477-82.
80. Imai, T., et al., *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion*. Cell, 1997. **91**(4): p. 521-30.
81. Inngjerdingen, M., B. Damaj, and A.A. Maghazachi, *Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells*. Blood, 2001. **97**(2): p. 367-75.
82. Taub, D.D., et al., *Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 1995. **155**(8): p. 3877-88.
83. Nieto, M., et al., *Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3330-9.

84. Kim, C.H., et al., *CCR7 ligands, SLC/6Ckine/Exodus2/TCA4 and CKbeta-11/MIP-3beta/ELC, are chemoattractants for CD56(+)CD16(-) NK cells and late stage lymphoid progenitors*. Cell Immunol, 1999. **193**(2): p. 226-35.
85. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions*. Science, 1998. **279**(5349): p. 381-4.
86. Allavena, P., et al., *Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3*. Eur J Immunol, 1994. **24**(12): p. 3233-6.
87. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 173-83.
88. Fernandez, N.C., et al., *Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo*. Nat Med, 1999. **5**(4): p. 405-11.
89. Draghi, M., et al., *NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2688-98.
90. Amakata, Y., et al., *Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes*. Clin Exp Immunol, 2001. **124**(2): p. 214-22.
91. Gerosa, F., et al., *Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 327-33.
92. Granucci, F., et al., *A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation*. J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 287-95.
93. Pallandre, J.R., et al., *Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4420-4.
94. Piccioli, D., et al., *Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells*. J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 335-41.
95. Bassing, C.H., W. Swat, and F.W. Alt, *The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination*. Cell, 2002. **109** Suppl: p. S45-55.
96. Quan, F.S., et al., *Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3514-24.
97. O'Leary, J.G., et al., *T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 507-16.

98. Paust, S., B. Senman, and U.H. von Andrian, *Adaptive immune responses mediated by natural killer cells*. Immunol Rev, 2010. **235**(1): p. 286-96.
99. Paust, S., et al., *Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses*. Nat Immunol, 2010. **11**(12): p. 1127-35.
100. Sun, J.C., J.N. Beilke, and L.L. Lanier, *Adaptive immune features of natural killer cells*. Nature, 2009. **457**(7229): p. 557-61.
101. Gaoni, Y. and R. Mechoulam, *The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish*. J Am Chem Soc, 1971. **93**(1): p. 217-24.
102. Devane, W.A., et al., *Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain*. Mol Pharmacol, 1988. **34**(5): p. 605-13.
103. Matsuda, L.A., et al., *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA*. Nature, 1990. **346**(6284): p. 561-4.
104. Munro, S., K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar, *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids*. Nature, 1993. **365**(6441): p. 61-5.
105. Toth, A., P.M. Blumberg, and J. Boczan, *Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1)*. Vitam Horm, 2009. **81**: p. 389-419.
106. Devane, W.A., et al., *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1946-9.
107. Mechoulam, R., et al., *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(1): p. 83-90.
108. Hanus, L., et al., *2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 3662-5.
109. Harris, L.H., *Rethinking maternal-fetal conflict: gender and equality in perinatal ethics*. Obstet Gynecol, 2000. **96**(5 Pt 1): p. 786-91.
110. Porter, A.C., et al., *Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **301**(3): p. 1020-4.
111. Sugiura, T. and K. Waku, *2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors*. Chem Phys Lipids, 2000. **108**(1-2): p. 89-106.
112. Ueda, N., et al., *Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol*. Biofactors, 2011. **37**(1): p. 1-7.

113. Matias, I. and V. Di Marzo, *Endocannabinoid synthesis and degradation, and their regulation in the framework of energy balance*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(3 Suppl): p. 15-26.
114. Sanchez, A.J. and A. Garcia-Merino, *Neuroprotective agents: cannabinoids*. Clin Immunol, 2012. **142**(1): p. 57-67.
115. Ameri, A., *The effects of cannabinoids on the brain*. Prog Neurobiol, 1999. **58**(4): p. 315-48.
116. Kumar, R.N., W.A. Chambers, and R.G. Pertwee, *Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids*. Anaesthesia, 2001. **56**(11): p. 1059-68.
117. Carr, T.P., E.D. Jesch, and A.W. Brown, *Endocannabinoids, metabolic regulation, and the role of diet*. Nutr Res, 2008. **28**(10): p. 641-50.
118. Klein, T.W., et al., *The cannabinoid system and immune modulation*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 486-96.
119. Massa, F. and K. Monory, *Endocannabinoids and the gastrointestinal tract*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(3 Suppl): p. 47-57.
120. Sarzani, R., *Endocannabinoids, blood pressure and the human heart*. J Neuroendocrinol, 2008. **20 Suppl 1**: p. 58-62.
121. Storr, M.A. and K.A. Sharkey, *The endocannabinoid system and gut-brain signalling*. Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(6): p. 575-82.
122. Stadel, R., K.H. Ahn, and D.A. Kendall, *The cannabinoid type-1 receptor carboxyl-terminus, more than just a tail*. J Neurochem, 2011. **117**(1): p. 1-18.
123. Felder, C.C., et al., *Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones*. Mol Pharmacol, 1992. **42**(5): p. 838-45.
124. Ho, B.Y., L. Current, and J.G. Drewett, *Role of intracellular loops of cannabinoid CB(1) receptor in functional interaction with G(alpha16)*. FEBS Lett, 2002. **522**(1-3): p. 130-4.
125. Bouaboula, M., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1*. Biochem J, 1995. **312 ( Pt 2)**: p. 637-41.
126. Daaka, Y., et al., *Induction of interleukin-2 receptor alpha gene by delta9-tetrahydrocannabinol is mediated by nuclear factor kappaB and CB1 cannabinoid receptor*. DNA Cell Biol, 1997. **16**(3): p. 301-9.

127. Mackie, K. and B. Hille, *Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 3825-9.
128. Herrera, B., et al., *The CB2 cannabinoid receptor signals apoptosis via ceramide-dependent activation of the mitochondrial intrinsic pathway*. Exp Cell Res, 2006. **312**(11): p. 2121-31.
129. Bouaboula, M., et al., *Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression*. Eur J Biochem, 1996. **237**(3): p. 704-11.
130. Mackie, K., *Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system*. Handb Exp Pharmacol, 2005(168): p. 299-325.
131. Howlett, A.C., et al., *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 161-202.
132. Pertwee, R.G. and R.A. Ross, *Cannabinoid receptors and their ligands*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2002. **66**(2-3): p. 101-21.
133. Galiegue, S., et al., *Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations*. Eur J Biochem, 1995. **232**(1): p. 54-61.
134. Tsou, K., et al., *Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system*. Neuroscience, 1998. **83**(2): p. 393-411.
135. Atwood, B.K. and K. Mackie, *CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(3): p. 467-79.
136. Stella, N., *Cannabinoid signaling in glial cells*. Glia, 2004. **48**(4): p. 267-77.
137. Walter, L., et al., *Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration*. J Neurosci, 2003. **23**(4): p. 1398-405.
138. Zoratti, C., et al., *Anandamide initiates Ca(2+) signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells*. Br J Pharmacol, 2003. **140**(8): p. 1351-62.
139. Ofek, O., et al., *Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(3): p. 696-701.
140. Storr, M., et al., *Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus*. Can J Physiol Pharmacol, 2002. **80**(1): p. 67-76.
141. Hillsley, K., et al., *Activation of the cannabinoid 2 (CB2) receptor inhibits murine mesenteric afferent nerve activity*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(9): p. 769-77.

142. Duncan, M., et al., *Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **295**(1): p. G78-G87.
143. Hillard, C.J., R.A. Harris, and A.S. Bloom, *Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985. **232**(3): p. 579-88.
144. Martin, B.R., *Cellular effects of cannabinoids*. *Pharmacol Rev*, 1986. **38**(1): p. 45-74.
145. Pertwee, R.G., *The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids*. *Pharmacol Ther*, 1988. **36**(2-3): p. 189-261.
146. Howlett, A.C., J.M. Qualy, and L.L. Khachatrian, *Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs*. *Mol Pharmacol*, 1986. **29**(3): p. 307-13.
147. Howlett, A.C. and R.M. Fleming, *Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes*. *Mol Pharmacol*, 1984. **26**(3): p. 532-8.
148. Howlett, A.C., *Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantadol compounds*. *Life Sci*, 1984. **35**(17): p. 1803-10.
149. Howlett, A.C., *Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes*. *Mol Pharmacol*, 1985. **27**(4): p. 429-36.
150. Kobayashi, Y., et al., *Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells*. *J Biochem*, 2001. **129**(5): p. 665-9.
151. Wartmann, M., et al., *The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide*. *FEBS Lett*, 1995. **359**(2-3): p. 133-6.
152. Bidaut-Russell, M. and A.C. Howlett, *Cannabinoid receptor-regulated cyclic AMP accumulation in the rat striatum*. *J Neurochem*, 1991. **57**(5): p. 1769-73.
153. Childers, S.R., T. Sexton, and M.B. Roy, *Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes*. *Biochem Pharmacol*, 1994. **47**(4): p. 711-5.
154. Childers, S.R. and S.A. Deadwyler, *Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors*. *Biochem Pharmacol*, 1996. **52**(6): p. 819-27.
155. Deadwyler, S.A., et al., *Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995. **273**(2): p. 734-43.

156. Hampson, R.E., et al., *Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons.* Life Sci, 1995. **56**(23-24): p. 2081-8.
157. Burstein, S., et al., *Prostaglandins and cannabis XV. Comparison of enantiomeric cannabinoids in stimulating prostaglandin synthesis in fibroblasts.* Life Sci, 1986. **39**(19): p. 1813-23.
158. Burstein, S., et al., *Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid.* Biochem Pharmacol, 1994. **48**(6): p. 1253-64.
159. Hillard, C.J. and A.S. Bloom, *Possible role of prostaglandins in the effects of the cannabinoids on adenylate cyclase activity.* Eur J Pharmacol, 1983. **91**(1): p. 21-7.
160. Rhee, M.H., et al., *Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes.* J Neurochem, 1998. **71**(4): p. 1525-34.
161. Caterina, M.J., et al., *Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.* Science, 2000. **288**(5464): p. 306-13.
162. Tominaga, M., et al., *The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli.* Neuron, 1998. **21**(3): p. 531-43.
163. Cristino, L., et al., *Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain.* Neuroscience, 2006. **139**(4): p. 1405-15.
164. Mezey, E., et al., *Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3655-60.
165. Toth, A., et al., *Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain.* Brain Res Mol Brain Res, 2005. **135**(1-2): p. 162-8.
166. Kark, T., et al., *Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1.* Mol Pharmacol, 2008. **73**(5): p. 1405-12.
167. Birder, L.A., et al., *Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1.* Nat Neurosci, 2002. **5**(9): p. 856-60.
168. Birder, L.A., *TRPs in bladder diseases.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(8): p. 879-84.
169. Ross, R.A., *The enigmatic pharmacology of GPR55.* Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(3): p. 156-63.

170. Oka, S., et al., *Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(4): p. 928-34.
171. Kapur, A., et al., *Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(43): p. 29817-27.
172. Maccarrone, M., E. Dainese, and S. Oddi, *Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling*. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(11): p. 601-8.
173. Sugiura, T., et al., *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **215**(1): p. 89-97.
174. Prescott, S.M. and P.W. Majerus, *Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(2): p. 764-9.
175. Stella, N., P. Schweitzer, and D. Piomelli, *A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation*. *Nature*, 1997. **388**(6644): p. 773-8.
176. Ueda, H., et al., *A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain*. *J Neurochem*, 1993. **61**(5): p. 1874-81.
177. Tsutsumi, T., et al., *A lysophosphoinositide-specific phospholipase C distinct from other phospholipase C families in rat brain*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **317**(2): p. 331-6.
178. Tsutsumi, T., et al., *Lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain synaptic plasma membranes*. *Neurochem Res*, 1994. **19**(4): p. 399-406.
179. Wilson, R.I. and R.A. Nicoll, *Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses*. *Nature*, 2001. **410**(6828): p. 588-92.
180. Ohno-Shosaku, T., T. Maejima, and M. Kano, *Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals*. *Neuron*, 2001. **29**(3): p. 729-38.
181. Kreitzer, A.C. and W.G. Regehr, *Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells*. *Neuron*, 2001. **29**(3): p. 717-27.
182. Maejima, T., et al., *Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors*. *Neuron*, 2001. **31**(3): p. 463-75.
183. Heifets, B.D. and P.E. Castillo, *Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity*. *Annu Rev Physiol*, 2009. **71**: p. 283-306.



184. Robbe, D., et al., *Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8384-8.
185. Lafourcade, C.A. and B.E. Alger, *Distinctions among GABAA and GABAB responses revealed by calcium channel antagonists, cannabinoids, opioids, and synaptic plasticity in rat hippocampus*. Psychopharmacology (Berl), 2008. **198**(4): p. 539-49.
186. Crozier, R.A., et al., *Deprivation-induced synaptic depression by distinct mechanisms in different layers of mouse visual cortex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1383-8.
187. Bender, V.A., et al., *Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex*. J Neurosci, 2006. **26**(16): p. 4166-77.
188. Lafourcade, M., et al., *Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex*. PLoS One, 2007. **2**(8): p. e709.
189. Pan, B., C.J. Hillard, and Q.S. Liu, *Endocannabinoid signaling mediates cocaine-induced inhibitory synaptic plasticity in midbrain dopamine neurons*. J Neurosci, 2008. **28**(6): p. 1385-97.
190. Henneberger, C., S.J. Redman, and R. Grantyn, *Cortical efferent control of subcortical sensory neurons by synaptic disinhibition*. Cereb Cortex, 2007. **17**(9): p. 2039-49.
191. Carayon, P., et al., *Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3605-15.
192. Klein, T.W., *Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 400-11.
193. Pestonjamasp, V.K. and S.H. Burstein, *Anandamide synthesis is induced by arachidonate mobilizing agonists in cells of the immune system*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1394**(2-3): p. 249-60.
194. Bisogno, T., et al., *Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3315-23.
195. Di Marzo, V., et al., *Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells*. Biochem J, 1996. **316** ( Pt 3): p. 977-84.
196. Maccarrone, M., et al., *Human mast cells take up and hydrolyze anandamide under the control of 5-lipoxygenase and do not express cannabinoid receptors*. FEBS Lett, 2000. **468**(2-3): p. 176-80.

197. Maccarrone, M., et al., *Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes*. Arch Biochem Biophys, 2001. **393**(2): p. 321-8.
198. Varga, K., et al., *Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension*. FASEB J, 1998. **12**(11): p. 1035-44.
199. Herring, A.C., W.S. Koh, and N.E. Kaminski, *Inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and nuclear factor binding to CRE and kappaB elements by cannabinal, a minimally CNS-active cannabinoid*. Biochem Pharmacol, 1998. **55**(7): p. 1013-23.
200. Schwarz, H., F.J. Blanco, and M. Lotz, *Anadamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis*. J Neuroimmunol, 1994. **55**(1): p. 107-15.
201. Malfitano, A.M., et al., *Arvanil inhibits T lymphocyte activation and ameliorates autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2006. **171**(1-2): p. 110-9.
202. Ouyang, Y., et al., *Suppression of interleukin-2 by the putative endogenous cannabinoid 2-arachidonyl-glycerol is mediated through down-regulation of the nuclear factor of activated T cells*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(4): p. 676-83.
203. Killestein, J., et al., *Immunomodulatory effects of orally administered cannabinoids in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2003. **137**(1-2): p. 140-3.
204. Sacerdote, P., et al., *The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro*. J Neuroimmunol, 2005. **159**(1-2): p. 97-105.
205. Sanchez, C., G. Velasco, and M. Guzman, *Metabolic stimulation of mouse spleen lymphocytes by low doses of delta9-tetrahydrocannabinol*. Life Sci, 1997. **60**(19): p. 1709-17.
206. Ribeiro, A., et al., *Anandamide prior to sensitization increases cell-mediated immunity in mice*. Int Immunopharmacol, 2010. **10**(4): p. 431-9.
207. Tanikawa, T., K. Kurohane, and Y. Imai, *Induction of preferential chemotaxis of unstimulated B-lymphocytes by 2-arachidonoylglycerol in immunized mice*. Microbiol Immunol, 2007. **51**(10): p. 1013-9.
208. Kaminski, N.E., et al., *Suppression of the humoral immune response by cannabinoids is partially mediated through inhibition of adenylate cyclase by a pertussis toxin-sensitive G-protein coupled mechanism*. Biochem Pharmacol, 1994. **48**(10): p. 1899-908.

209. Berdyshev, E.V., et al., *Influence of fatty acid ethanolamides and delta9-tetrahydrocannabinol on cytokine and arachidonate release by mononuclear cells*. Eur J Pharmacol, 1997. **330**(2-3): p. 231-40.
210. Valk, P., et al., *Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1448-57.
211. Kishimoto, S., et al., *2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells*. J Biochem, 2004. **135**(4): p. 517-24.
212. Cabral, G.A., et al., *Anandamide inhibits macrophage-mediated killing of tumor necrosis factor-sensitive cells*. Life Sci, 1995. **56**(23-24): p. 2065-72.
213. Ross, R.A., H.C. Brockie, and R.G. Pertwee, *Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide*. Eur J Pharmacol, 2000. **401**(2): p. 121-30.
214. Facci, L., et al., *Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3376-80.
215. Bueb, J.L., D.M. Lambert, and E.J. Tschirhart, *Receptor-independent effects of natural cannabinoids in rat peritoneal mast cells in vitro*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1538**(2-3): p. 252-9.
216. Maestroni, G.J., *The endogenous cannabinoid 2-arachidonoyl glycerol as in vivo chemoattractant for dendritic cells and adjuvant for Th1 response to a soluble protein*. FASEB J, 2004. **18**(15): p. 1914-6.
217. Matias, I., et al., *Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells*. Eur J Biochem, 2002. **269**(15): p. 3771-8.
218. Do, Y., et al., *Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NF-kappaB-dependent apoptosis: novel role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2373-82.
219. Hilado, C.J., A. Furst, and W.H. Marcussen, *The use of the NASA animal exposure chamber in fire toxicity tests*. Proc West Pharmacol Soc, 1976. **19**: p. 397-400.
220. Klein, T.W., C. Newton, and H. Friedman, *Inhibition of natural killer cell function by marijuana components*. J Toxicol Environ Health, 1987. **20**(4): p. 321-32.

221. Specter, S.C., et al., *Marijuana effects on immunity: suppression of human natural killer cell activity of delta-9-tetrahydrocannabinol*. *Int J Immunopharmacol*, 1986. **8**(7): p. 741-5.
222. Kishimoto, S., et al., *Endogenous cannabinoid receptor ligand induces the migration of human natural killer cells*. *J Biochem*, 2005. **137**(2): p. 217-23.
223. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(1): p. 24-37.
224. Marczylo, T.H., et al., *Anandamide levels in human female reproductive tissues: solid-phase extraction and measurement by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Anal Biochem*, 2010. **400**(2): p. 155-62.
225. Petersen, G., et al., *Endocannabinoid metabolism in human glioblastomas and meningiomas compared to human non-tumour brain tissue*. *J Neurochem*, 2005. **93**(2): p. 299-309.
226. Pagotto, U., et al., *Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(6): p. 2687-96.
227. Nithipatikom, K., et al., *2-arachidonoylglycerol: a novel inhibitor of androgen-independent prostate cancer cell invasion*. *Cancer Res*, 2004. **64**(24): p. 8826-30.
228. Ligresti, A., et al., *Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth*. *Gastroenterology*, 2003. **125**(3): p. 677-87.
229. Schmid, P.C., et al., *Anandamide and other N-acyl ethanolamines in human tumors*. *Lipids*, 2002. **37**(9): p. 907-12.
230. Cianchi, F., et al., *Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha-mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(23): p. 7691-700.
231. Bifulco, M., et al., *Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy*. *Br J Pharmacol*, 2006. **148**(2): p. 123-35.
232. Joseph, J., et al., *Anandamide is an endogenous inhibitor for the migration of tumor cells and T lymphocytes*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. **53**(8): p. 723-8.
233. Giuliano, M., et al., *Apoptosis induced in HepG2 cells by the synthetic cannabinoid WIN: involvement of the transcription factor PPARgamma*. *Biochimie*, 2009. **91**(4): p. 457-65.

234. Czifra, G., et al., *Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2009. **135**(4): p. 507-14.
235. Stella, N., *Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas*. Glia, 2010. **58**(9): p. 1017-30.
236. Carracedo, A., et al., *Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes*. Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6748-55.
237. Galve-Roperh, I., et al., *Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation*. Nat Med, 2000. **6**(3): p. 313-9.
238. Velasco, G., et al., *Cannabinoids and ceramide: two lipids acting hand-by-hand*. Life Sci, 2005. **77**(14): p. 1723-31.
239. DeMorrow, S., et al., *The endocannabinoid anandamide inhibits cholangiocarcinoma growth via activation of the noncanonical Wnt signaling pathway*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **295**(6): p. G1150-8.
240. Massi, P., et al., *Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(3): p. 838-45.
241. Nithipatikom, K., et al., *A new class of inhibitors of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis and invasion of prostate cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(4): p. 1028-33.
242. Mimeault, M., et al., *Anti-proliferative and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines: implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and ceramide production*. Prostate, 2003. **56**(1): p. 1-12.
243. Blazquez, C., et al., *Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 529-31.
244. Blazquez, C., et al., *Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5617-23.
245. Hart, S., O.M. Fischer, and A. Ullrich, *Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor*. Cancer Res, 2004. **64**(6): p. 1943-50.
246. McKallip, R.J., M. Nagarkatti, and P.S. Nagarkatti, *Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3281-9.

247. Tramer, M.R., et al., *Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review*. *BMJ*, 2001. **323**(7303): p. 16-21.
248. Baldwin, G.C., et al., *Marijuana and cocaine impair alveolar macrophage function and cytokine production*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **156**(5): p. 1606-13.
249. Sidney, S., et al., *Marijuana use and mortality*. *Am J Public Health*, 1997. **87**(4): p. 585-90.
250. Donald, P.J., *Marijuana smoking--possible cause of head and neck carcinoma in young patients*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1986. **94**(4): p. 517-21.
251. Rybakov, A.I., V.S. Kulikov, and N.V. Terekhova, *[Metabolic reaction in patients with chronic relapsing aphthous stomatitis during their treatment with prodigiosan]*. *Stomatologia (Mosk)*, 1975. **54**(5): p. 8-12.
252. Hirschberg, D.L., et al., *Inflammation after axonal injury has conflicting consequences for recovery of function: rescue of spared axons is impaired but regeneration is supported*. *J Neuroimmunol*, 1994. **50**(1): p. 9-16.
253. McKallip, R.J., et al., *Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression in vitro and in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **302**(2): p. 451-65.
254. Patel, V., et al., *Effects of acute and subchronic delta 9-tetrahydrocannabinol administration on the plasma catecholamine, beta-endorphin, and corticosterone levels and splenic natural killer cell activity in rats*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1985. **180**(2): p. 400-4.
255. Zamai, L., et al., *Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells*. *J Exp Med*, 1998. **188**(12): p. 2375-80.
256. Bergmann-Leitner, E.S. and S.I. Abrams, *Differential role of Fas/Fas ligand interactions in cytolysis of primary and metastatic colon carcinoma cell lines by human antigen-specific CD8+ CTL*. *J Immunol*, 2000. **164**(9): p. 4941-54.
257. Kasatori, N., et al., *A differential assay of NK-cell-mediated cytotoxicity in K562 cells revealing three sequential membrane impairment steps using three-color flow-cytometry*. *J Immunol Methods*, 2005. **307**(1-2): p. 41-53.
258. Lamy, V., et al., *Lupulone, a hop bitter acid, activates different death pathways involving apoptotic TRAIL-receptors, in human colon tumor cells and in their derived metastatic cells*. *Apoptosis*, 2008. **13**(10): p. 1232-42.

259. Mariani, S.M. and P.H. Krammer, *Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage*. Eur J Immunol, 1998. **28**(3): p. 973-82.
260. Wang, R., et al., *Differential regulation of the expression of CD95 ligand, receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), and TNF-alpha during T cell activation*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1983-90.
261. Tecchio, C., et al., *IFNalpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3837-44.
262. DeMorrow, S., et al., *Opposing actions of endocannabinoids on cholangiocarcinoma growth: recruitment of Fas and Fas ligand to lipid rafts*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 13098-113.
263. Kishimoto, S., et al., *2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 24469-75.
264. Cencioni, M.T., et al., *Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8688.
265. Zygmunt, P.M., et al., *Anandamide - the other side of the coin*. Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(2): p. 43-4.
266. Zoerner, A.A., et al., *Quantification of endocannabinoids in biological systems by chromatography and mass spectrometry: a comprehensive review from an analytical and biological perspective*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1811**(11): p. 706-23.

## Résumé

Les endocannabinoïdes, anandamide (AEA) et 2-arachidonoylglycérol (2-AG), appartiennent au système endocannabinoïde et sont impliqués dans la régulation de nombreux systèmes biologiques. Ils ont un rôle dans la modulation du système immunitaire et la défense anti-tumorale. Dans cette étude, nous avons montré que l'AEA et le 2-AG peuvent moduler l'activation des cellules Natural Killer CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> (NK) et des cellules NK92. A de faibles doses, ils potentialisent la production d'IFN  $\gamma$  induite par des doses suboptimales d'IL-12, d'IL-15 et d'IL-2. En outre, l'AEA et le 2-AG potentialisent la cytotoxicité des cellules NK. Des expériences de quantification des transcrits codant FasL, TRAIL, perforine et granzyme et des expériences d'inhibition indiquent que cette augmentation de la cytotoxicité est corrélée à une augmentation de l'expression de FasL, tandis que la production de granzyme, de perforine et l'expression TRAIL reste inchangées. Les effets des endocannabinoïdes sur les cellules NK sont inhibés en présence d'un antagoniste du récepteur endocannabinoïdien de type 2 (CB2). Ces travaux *in vitro* ont été confirmés *in vivo* sur un modèle de tumeur murine. Les cellules NK murines stimulées *ex-vivo* par les endocannabinoïdes et réinjectées en intra-tumoral, induisent un ralentissement significatif de la croissance tumorale. Ces résultats montrent pour la première fois que les endocannabinoïdes AEA et 2-AG utilisées à faible dose sont impliqués dans la modulation des activités régulatrices (objectivée par la production d'IFN $\gamma$ ) et cytotoxiques des cellules NK.

## Mots clefs

Endocannabinoïdes, Anandamide, 2-arachidonoyl-glycérol, Natural killer, cytotoxicité, FasL