

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Stratégie de production d'anticorps monoclonaux spécifiques de Ly49B, un récepteur particulier des cellules NK murines

par

Annie Lévesque

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc)
en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Examineur externe	Noëlla Deslauriers Département de biochimie et microbiologie Faculté des sciences et de génie Université Laval
Examineur interne	Claude Daniel INRS-Institut Armand-Frappier
Directrice de recherche	Suzanne Lemieux INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Les cellules NK de souris peuvent exprimer une variété de récepteurs dont la majorité appartiennent à la famille Ly49 qui contient des récepteurs d'activation et des récepteurs d'inhibition. Le récepteur Ly49B, ayant un ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) dans sa portion cytoplasmique, il a le potentiel d'être un récepteur d'inhibition. Toutefois, sa fonction n'a toujours pas été démontrée. Au plan structural, il est le récepteur le plus différent des autres membres de la famille Ly49. Exploitant cette particularité, nous avons comme objectif de produire un anticorps monoclonal spécifique de ce récepteur afin de pouvoir l'utiliser pour déterminer son expression sur différentes cellules notamment les cellules NK, LAK et NKT dans différents tissus de différentes souches de souris, pour analyser la modulation de son expression selon l'haplotype H-2 et finalement pour confirmer sa capacité à inhiber la cytotoxicité des cellules NK.

Tout d'abord, 9 rats ont été immunisés avec des cellules LAK de souris. Après avoir analysé les sérums immuns, 4 rats ont été choisis pour faire des fusions entre les cellules spléniques et des cellules myélomateuses de souris. Lors de ces 4 fusions, 1550 surnageants d'hybridomes ont été analysés en ELISA pour la présence d'anticorps spécifiques de séquences uniques du récepteur Ly49B insérées dans des phages filamenteux. 57% des hybridomes sécrétaient des Ig, mais aucune de celles-ci ne réagissait avec le récepteur Ly49B. Afin de diminuer la compétition antigénique attribuable aux autres protéines de surface des cellules LAK, nous avons tenté de produire le domaine extracellulaire du récepteur Ly49B soluble en utilisant un système d'expression de protéine dans les levures *Pichia pastoris*. De nombreuses difficultés sont survenues lors des transformations et seulement 90 transformants ont pu être analysés. Malheureusement, aucun de ceux-ci ne sécrétait une forme stable du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B. Finalement, nous avons transfecté des cellules humaine Jurkat T J77.6 avec l'ADNc du Ly49b inséré dans le vecteur

d'expression eucaryote SR α puro. Cinq rats ont été immunisés avec ces cellules. Après avoir analysé les sérums pour nous assurer que les animaux avaient réagi à l'immunogène, les fusions ont été effectuées. Lors des 4 premières fusions, 341 surnageants d'hybridomes ont été analysés par cytométrie en flux pour la présence d'Ig spécifiques du récepteur Ly49B. Toutefois, étant donné que seulement 10% des hybridomes produisaient des Ig, il n'est pas surprenant qu'aucun de ceux-ci n'ait reconnu le récepteur Ly49B. La dose administrée au dernier rat a été augmentée. Un hybridome produisant un anticorps se liant sélectivement aux cellules transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49B a ainsi pu être identifié. Toutefois, malgré que nous ayons atteint cet objectif, le temps alloué pour mes études de maîtrise ne m'a pas permis de poursuivre sa caractérisation.

En résumé, l'échec des fusions avec les cellules spléniques des animaux immunisés avec des cellules LAK est probablement attribuable au faible niveau d'expression du récepteur Ly49B sur ces cellules. L'immunisation d'animaux avec la portion extracellulaire soluble de la protéine aurait été la meilleure alternative, mais nous ne sommes malheureusement pas parvenus à la produire. Finalement, l'immunisation des rats avec une forte dose de cellules transfectées a porté fruit. Des analyses futures nous permettront de confirmer la spécificité de l'anticorps et d'enfin poursuivre la caractérisation de ce récepteur particulier.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice de recherche le Dr Suzanne Lemieux. Je lui suis reconnaissante de m'avoir permis de faire ce projet de maîtrise dans son laboratoire. L'expérience que j'ai acquise pendant ces deux années d'études est inestimable.

J'aimerais aussi remercier le Dr François Shareck pour son expertise en biologie moléculaire et avec les levures et le Dr Pascale Duplay pour m'avoir donné des conseils judicieux pour la production des transfectants Ly49B.

De plus, je ne peux laisser sous silence l'aide technique d'Yvette Lusignan, dont les conseils m'ont beaucoup aidée. Je remercie également Anick et Karine pour les bons moments passés au laboratoire et les discussions scientifiques ou non que j'ai eues avec elle.

Je veux remercier la Fondation Armand-Frappier pour son soutien financier et son encouragement à poursuivre mes recherches. Merci aussi à la Société de Recherche sur le Cancer, Inc. qui a financé ce projet.

Finalement, je tiens à remercier mon copain, Raynald, qui m'a supportée pendant plusieurs années d'études et qui a partagé avec moi les bons et moins bons moments que la science peut nous faire vivre.

Merci à tous,

Annie

Table des matières

Résumé.....	III
Remerciements.....	V
Liste des figures.....	IX
Liste des tableaux.....	X
Liste des abréviations.....	XI
A. Introduction.....	1
B. Revue bibliographique.....	5
1. <u>Les cellules NK</u>	6
1.1 Fonctions effectrices des cellules NK.....	7
1.1.1 Fonction cytotoxique.....	7
1.1.2 Fonction sécrétrice.....	8
2. <u>Récepteurs d'activation et d'inhibition</u>	9
2.1 Propriétés des récepteurs d'activation et signalisation intracellulaire...9	
2.2 Propriétés des récepteurs d'inhibition et signalisation intracellulaire..10	
2.3 Familles des récepteurs d'activation et d'inhibition.....12	
2.3.1 Superfamille des immunoglobulines.....12	
2.3.2 Superfamille des lectines de type C.....13	
3. <u>Famille des récepteurs Ly49</u>	18
3.1 Classification	18
3.2 Expression cellulaire.....	20
3.3 Structure.....	22
3.4 Ligands	25
3.5 Caractéristiques particulières du récepteur Ly49B.....	29
4. <u>Polyréactivité des anticorps anti-Ly49</u>	36
5. <u>Raison d'être et objectifs du projet</u>	39
C. Méthodologie.....	41
1. <u>Enrichissement de cellules NK et production de cellules LAK</u>	42
1.1 Isolement de splénocytes.....	42
1.2 Sélection négative des cellules NK.....	42

1.3 Production de cellules LAK.....	43
2. <u>Production du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B</u>	43
2.1 Clonage à l'intérieur du vecteur d'expression pPICZ α A.....	43
2.2 Préparation et transformation de levures compétentes.....	47
2.3 Criblage des transformants résistants à la zéocine.....	48
3. <u>Production de cellules transfectées avec le récepteur Ly49B</u>	49
3.1 Clonage à l'intérieur du vecteur d'expression SR α puro.....	49
3.2 Transfection de cellules Jurkat J77.6.....	50
3.3 Criblage des transfectants résistants à la puromycine.....	50
4. <u>Immunisations</u>	51
4.1 Avec des cellules LAK de souris CBA/J.....	51
4.2 Avec des cellules transfectées.....	51
5. <u>Fusions</u>	51
6. <u>Production de la banque de phages recombinants</u>	54
6.1 Identification des séquences cibles.....	54
6.2 Préparation des inserts.....	54
6.3 Préparation du vecteur.....	55
6.4 Production des vecteurs recombinants.....	57
6.5 Test d'infectiosité des phages recombinants.....	57
6.6 Analyse des phages par séquençage.....	58
6.7 Amplification et purification des phages.....	59
7. <u>ELISA</u>	60
8. <u>Marquage de cellules pour l'analyse en cytométrie</u>	63
9. <u>Absorption de sérums</u>	64
D. Résultats	65
1. <u>Immunisation d'animaux avec des cellules LAK</u>	66
1.1 Phénotypage de cellules NK et LAK de souris CBA/J.....	66
1.2 Production de phages recombinants.....	70
1.3 Mise au point du test ELISA.....	70
1.4 Immunisation et analyse de sérums.....	73
1.5 Fusions et criblage.....	78

2. <u>Production du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B</u>	81
2.1 Clonage dans le vecteur pPICZ α	82
2.2 Transformation de levures <i>P. pastoris</i> et analyse de sécrétion.....	82
3. <u>Immunisation d'animaux avec des cellules transfectées</u>	89
3.1 Clonage dans le vecteur SR α puro.....	89
3.2 Transfection de cellules J77.6 et criblage.....	92
3.3 Mise au point du test de criblage par cytométrie.....	92
3.4 Immunisation et analyse de sérums.....	93
3.5 Fusions et criblage.....	98
E. Discussion	103
F. Conclusion et Perspectives	120
Listes des références	123
Annexe 1 : Milieux, tampons et solutions	137
Annexe 2 : Carte génomique du vecteur pPICZαA	140
Annexe 3 : Carte génomique du vecteur SRαpuro	141

Liste des figures

Figure 1 :	Complexe des gènes NK murin.....	14
Figure 2 :	Structure de récepteurs Ly49.....	23
Figure 3 :	Comparaison des séquences consensus des groupes Ly49A, Ly49C et du rat avec la séquence du Ly49B.....	30
Figure 4 :	Test ELISA.....	61
Figure 5 :	Phénotypage des cellules NK et LAK de souris CBA/J.....	67
Figure 6 :	Mise au point du test ELISA.....	71
Figure 7 :	Analyse des sérums des rats A1 à A9.....	75
Figure 8 :	Production du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B.....	87
Figure 9 :	Production de cellules transfectées avec le récepteur Ly49B.....	90
Figure 10 :	Mise au point du test de criblage par cytométrie en flux.....	94
Figure 11 :	Analyse des sérums des rats A10 à A13.....	96
Figure 12 :	Obtention d'un surnageant d'hybridome anti-Ly49B.....	101

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des récepteurs Ly49.....	19
Tableau 2 : Présence des récepteurs Ly49 chez différentes souches de souris.....	21
Tableau 3 : Spécificité des AcMo anti-Ly49.....	37
Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour les amplifications par PCR et le séquençage.....	44
Tableau 5 : Caractéristiques des souches d' <i>Escherichia coli</i> et de <i>Pichia</i> <i>pastoris</i>	46
Tableau 6 : Protocole d'immunisation des rats.....	52
Tableau 7 : Séquences des amorces insérées dans le phage fUSE5.....	56
Tableau 8 : Analyse des hybridomes des fusions A3, A2, A9 et A6.....	79
Tableau 9 : Transformation de levures <i>P. pastoris</i> avec pZ α 49b.....	83
Tableau 10 : Analyse des hybridomes des fusions A10 à A13.....	99

Liste des abréviations

aa :	acide (s) aminé (s)
AcMo :	anticorps monoclonal (aux)
ADCC :	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (antibody dependent cellular cytotoxicity)
ADN :	acide déoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AOX1 :	alcool oxydase 1
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ATP :	adénosine triphosphate
cm :	centimètre (s)
CCPAL :	conseil canadien de protection des animaux de laboratoire
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CPI :	« Current Protocols in Immunologie »
CRD :	« carbohydrate recognition domain »
cyt :	domaine cytoplasmique
DO :	densité optique
ELISA :	« enzyme-linked immunosorbent assay »
FasL :	« Fas ligand »
g :	gramme (s)
GM-CSF :	facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (granulocytes macrophages colony stimulating factor)
h :	heure (s)
HRP :	« horseradish peroxidase »
IFN :	interféron
Ig :	immunoglobuline
INRS :	Institut national de la recherche scientifique
IL :	interleukine
IRB :	Institut de recherche en biotechnologie

ITAM :	« immunoreceptor tyrosine-based activation motif »
ITIM :	« immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif »
JA :	cellule Jurkat transfectée avec le Ly49A
JB :	cellule Jurkat transfectée avec le Ly49B
JC :	cellule Jurkat transfectée avec le Ly49C
Jwt :	cellule Jurkat de type sauvage
kb :	kilobase (s)
kDa :	kiloDalton (s)
KIR :	« killer Ig-like receptor »
kV :	kilovolt (s)
L :	litre (s)
LAK :	« lymphokine activated killer »
LBfs :	LB faible en sel
M :	molaire
Mb :	mégabase (s)
M-CSF :	facteur de stimulation des colonies de macrophages (macrophages colony stimulating factor)
µg :	microgramme (s)
µl :	microlitre (s)
µF :	microfarad (s)
min :	minute (s)
ml :	millilitre (s)
mM :	millimolaire (s)
ng :	nanogramme (s)
nm :	nanomètre (s)
NK :	« natural killer »
NKT :	cellules exprimant des marqueurs des lymphocytes T et des cellules NK
PAGE :	« polyacrylamide gel electrophoresis »
pb :	paire de bases
PBS :	eau salée physiologique tamponnée à pH 7.4

XIII

PCR :	réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)
PEG :	polyéthylène glycol
PI :	phospholipide
PMN :	polymorphonucléaire neutrophile
RT :	transcriptase inverse (reverse transcriptase)
SA :	streptavidine
SDS :	« sodium dodecyl sulfate »
sec :	seconde (s)
SVF :	sérum de veau fœtal
TBS :	tampon tris (tris buffered solution)
TCR :	récepteur des cellules T (T cell receptor)
TGF :	« transforming growth factor »
TM :	domaine transmembranaire
TNF :	facteur nécrosant des tumeurs (tumor necrosis factor)
zéo :	zéocine

A. Introduction

Les cellules NK ont été longtemps sous-estimées. En effet, ce n'est qu'au milieu des années 70 qu'elles ont été identifiées comme une population distincte de lymphocytes (Herberman *et al*; 1975, Kiessling *et al*; 1975). Depuis ce temps, la fonction de ces cellules a été mieux comprise, mais l'hétérogénéité de cette population complique grandement les études de caractérisation. De plus, comme aucune lignée cellulaire NK murine n'existe et que cette population ne représente que 4 à 10% des cellules lymphoïdes, il a fallu développer des techniques d'enrichissement de cellules NK à partir de cellules spléniques pour pouvoir commencer à les étudier.

Après avoir développé une technique d'enrichissement basée sur une sélection négative des cellules NK, notre laboratoire a commencé à caractériser les récepteurs des cellules murines (Morelli *et al*; 1992). Le problème majeur pour analyser les cellules NK a été l'absence d'anticorps monoclonaux les reconnaissant spécifiquement. C'est ce problème qui a mené au développement des anticorps de souris 4LO3311 et 4LO439 qui se lient spécifiquement à des sous-populations de cellules NK (Lemieux *et al*; 1991). En 1997, l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 4LO3311 a été identifié comme étant un membre de la famille des récepteurs Ly49 : le Ly49C (Gosselin *et al*; 1997). Plus récemment, il a été déterminé que l'anticorps monoclonal 4LO439 reconnaissait quant à lui l'allèle C57BL/6 du récepteur Ly49G2 (Dépatie *et al*; 1999). C'est avec ces anticorps et d'autres qui reconnaissent d'autres récepteurs Ly49 que la régulation des fonctions des cellules NK a pu être démystifiée.

La famille des récepteurs Ly49 comprend maintenant 23 membres. Ils sont exprimés sur des sous-populations de cellules NK qui se chevauchent. Ces sous-groupes sont très variables, car toutes les souches de souris n'expriment pas tous les récepteurs Ly49 et, d'une souche de souris à l'autre, un récepteur peut être exprimé à des niveaux variables sur des populations de taille différente. La caractérisation de moins de la moitié des récepteurs Ly49 a été faite, car plusieurs récepteurs ne sont pas reconnus spécifiquement par des anticorps

monoclonaux. En effet, la grande homologie qui existe entre ces récepteurs fait en sorte que la majorité des anticorps reconnaissent plus d'un récepteur Ly49. Ainsi, étant donné que généralement plus d'un récepteur est présent sur chaque cellule NK, l'étude *in vivo* des récepteurs Ly49 avec les anticorps qui existent est très complexe, car nous ne disposons pas encore d'un ensemble de réactifs qui permettraient le phénotypage complet des récepteurs des cellules NK.

Nous croyons que la caractérisation des récepteurs Ly49 passe inévitablement par la production d'un anticorps monoclonal spécifique pour chacun d'eux. Nous avons donc entrepris de produire un tel anticorps spécifique pour le récepteur Ly49B. Pour l'instant, cette protéine n'est liée par aucun anticorps monoclonal et par conséquent peu de choses sont connues à son sujet. Le récepteur Ly49B est le plus particulier des récepteurs Ly49, tant au niveau de sa localisation chromosomique que de sa séquence protéique. En effet, le gène *Ly49b* est situé à environ 750 kb du groupe Ly49 qui s'étend sur un court intervalle de 420 kb du chromosome 6 murin. La séquence protéique de ce récepteur démontre bien son individualité car elle présente une identité de seulement 48% avec tous les autres récepteurs Ly49. Un anticorps spécifique pourrait être utilisé pour caractériser l'expression du récepteur Ly49B sur différents types cellulaires et chez différentes souches de souris. De plus, il serait alors possible de confirmer la capacité inhibitrice du récepteur. Aucun ligand du récepteur Ly49B ayant été identifié à ce jour, un anticorps monoclonal serait donc un précieux outil pour évaluer les conséquences de l'engagement de ce récepteur.

Au cours de ce projet de maîtrise, trois immunogènes ont été développés pour induire chez le rat une réponse immunitaire contre le récepteur Ly49B. Puis, des phages recombinants exprimant des séquences de huit acides aminés sélectionnées dans la portion extracellulaire de Ly49B ont été produits. Ces phages ont été utilisés pour le criblage d'hybridomes par ELISA, une technique qui a aussi été mise au point au cours de ce projet.

L'objectif général du laboratoire étant de caractériser les récepteurs Ly49, ce projet a permis d'élaborer une stratégie de production de réactifs spécifiques qui pourrait être appliquée à l'analyse d'autres récepteurs.

B. Revue bibliographique

1. Les cellules NK

Les cellules NK (natural killer) sont de grands lymphocytes granuleux dérivés de la moelle osseuse qui ont un précurseur commun avec les lymphocytes T (Spits *et al*; 1995). Ces cellules se retrouvent principalement dans la rate et, chez la souris, leur activité atteint le niveau maximal vers le troisième mois de vie (Kiessling *et al*; 1975). Cette petite population de cellules lymphoïdes (4 à 10%) (Vély & Vivier; 1996) a commencé à intéresser la communauté scientifique lorsque leur aptitude à lyser les cellules tumorales fut remarquée (Herberman *et al*; 1975, Kiessling *et al*; 1975). Vingt-cinq années plus tard, de nombreuses études ont révélé l'importance biologique des cellules NK dans plusieurs processus biologiques notamment dans la tolérance mère-fœtus (Yokoyama; 1997), la défense antivirale (Biron *et al*; 1999), le contrôle de l'auto-immunité (Shi *et al*; 2001), la lutte anti-tumorale (Whiteside *et al*; 1998) et le rejet de greffe de moelle osseuse incompatible (George *et al*; 1997).

Contrairement aux lymphocytes T, dont l'activation dépend de la reconnaissance d'un antigène par le TCR, les cellules NK ne nécessitent pas d'immunisation préalable pour acquérir leur activité cytotoxique. Par conséquent, la réponse NK est beaucoup plus rapide que celle des lymphocytes T et B. Elles diffèrent aussi des lymphocytes T et B par le fait qu'elles n'expriment aucun récepteur spécifique à l'antigène ce qui implique qu'aucun réarrangement des gènes qui codent pour ces récepteurs ne survient (Shinkai *et al*; 1992). De plus, les cellules NK ne sont pas restreintes par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), à tout le moins pas de la façon dont le sont les lymphocytes T (Trinchieri; 1989). En effet, contrairement à ces derniers qui sont alertés par un peptide étranger présenté par une molécule du CMH du soi, l'activation de la cytotoxicité des cellules NK est une conséquence de la non-reconnaissance des molécules du CMH de classe I du soi. Ainsi, une cellule qui exprime une molécule du CMH de classe I allogénique ou un niveau suboptimal de molécule du CMH du soi sera identifiée et détruite par la cellule NK (Ljunggren & Kärre; 1990).

Étant donné le grand nombre de publications qui ont pour sujet les cellules NK, les différences importantes qui existent dans la nature des récepteurs des cellules NK humaines et murines et le fait que le récepteur qui fait l'objet de ce mémoire ne se retrouve que chez la souris, seules les publications qui portent sur les cellules NK murines ont été considérées dans cette revue bibliographique. Cependant, dans certains cas des exemples spécifiques relatifs aux cellules NK humaines seront rapportés.

1.1 Fonctions effectrices des cellules NK

1.1.1 Fonction cytotoxique

La cytotoxicité est une des deux principales fonctions effectrices des cellules NK. Les cellules NK peuvent utiliser deux mécanismes pour induire la libération de l'arsenal lytique (perforine et granzymes) contenu dans leurs granules et par conséquent lyser la cellule cible par apoptose. D'abord, la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) permet aux cellules NK de lyser les cellules recouvertes d'immunoglobulines (Ig) via le récepteur à basse affinité pour les IgG, FcγRIII (CD16) (Vély & Vivier; 1996). Ainsi, les cellules exprimant à leur surface, par exemple, des protéines virales ou bactériennes peuvent être éliminées par les cellules NK si des anticorps anti-viraux ou anti-bactériens ont été produits suite à l'infection. D'autre part, la cytotoxicité dite naturelle permet l'activation des cellules NK par l'absence ou la modification des molécules du CMH de classe I du soi à la surface de leurs cibles. Cette observation est à la base de l'hypothèse du « missing self » selon laquelle les cellules NK seraient tenues en échec par toutes les cellules saines de l'hôte par l'expression d'un niveau normal de molécules du CMH de classe I sur ces dernières. Ainsi, lorsqu'une cellule est infectée par un pathogène et que celui-ci tente d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T en régulant à la baisse l'expression des molécules du CMH de classe I, la cellule NK quant à elle, n'est plus tenue en échec et elle peut éliminer la cellule infectée (Ljunggren & Kärre; 1990, Kärre; 1997).

Finalement, les cellules NK peuvent aussi induire l'apoptose de cellules cibles indépendamment de la perforine et des granzymes contenues dans les granules. En effet, les cellules NK expriment, lorsqu'elles sont activées, le ligand de Fas (FasL) qui permet la lyse des cellules cibles qui expriment le récepteur Fas qui contient un domaine de mort (Arase *et al*; 1995). Lorsque le récepteur Fas est engagé par son ligand, un signal pro-apoptotique (via les caspases) est envoyé dans la cellule cible et conséquemment cette dernière meurt par apoptose si aucune molécule anti-apoptotique n'intervient (Nagata; 1999). Les cellules du système immunitaire qui expriment FasL sont les lymphocytes T (Suda *et al*; 1995) et B (Hahne *et al*; 1996), les cellules NK (Arase *et al*; 1995), les macrophages (Kiener *et al*; 1997) et les granulocytes (Liles *et al*; 1996).

1.1.2 Fonction sécrétrice

La deuxième principale fonction effectrice des cellules NK est la sécrétion de cytokines. Dans une situation qui nécessite une réponse immunitaire, les cellules NK sont rapidement activées par la présence, entre autres, d'interféron (IFN) α/β , d'interleukine (IL) -1, -2, -4, -12, -15, -18 et du facteur nécrosant des tumeurs (TNF)- α (Scott & Trinchieri; 1995, Lanier; 1998, Fehniger *et al*; 1999). Plusieurs de ces cytokines agissent aussi sur le développement des cellules NK et leur migration vers les sites d'infection (Maghazachi; 1991, Pilaro *et al*; 1994, Lövik *et al*; 1995, Smyth *et al*; 1998, Liu *et al*; 2000). Les effets des cytokines sur les cellules NK sont multiples : prolifération, augmentation de la cytotoxicité, synthèse et sécrétion de cytokines. La production de cytokines fait des cellules NK un important intervenant entre les réponses immunitaires naturelle et spécifique. En effet, suite à une stimulation, les cellules NK activées par des lymphokines (LAK) peuvent à leur tour produire des cytokines comme l'IFN γ , le GM-CSF, le M-CSF, le TGF- β , le TNF- α , les IL-3, -5, -8, -10 et -13 (Seaman; 2000). Les cellules LAK peuvent aussi sécréter les chimiokines lymphotactine, MIP1 α et MIP1 β (Ortaldo *et al*; 2001). Étant donné que l'activation des cellules NK est très rapide, elles peuvent ainsi réguler les autres cellules du système

immunitaire par le biais des cytokines et chimiokines sécrétées. Par exemple, l'IFN γ sécrété par les cellules LAK est essentiel pour le contrôle des lymphocytes T auxiliaires et l'activation des macrophages (Peters *et al*; 1985, Scharton & Scott; 1993, Orange *et al*; 1995, Abbas *et al*; 1996). Cependant, il est important de noter que le profil de cytokines sécrétées varie avec les différents stimulus qui activent une cellule NK.

2. Récepteurs d'activation et d'inhibition

Les fonctions effectrices des cellules NK sont contrôlées par l'interaction de récepteurs d'activation et d'inhibition avec leurs ligands. Ce contrôle est extrêmement important car les cellules NK ne doivent évidemment pas lyser les cellules saines de l'hôte, ni sécréter des cytokines à tout moment. Il est à noter que le contrôle de ces deux fonctions est très lié, mais toutefois différent. En effet, il a été démontré que les récepteurs d'inhibition qui reconnaissent les molécules du CMH de classe I et qui sont responsables de l'inhibition de la production d'IFN γ diffèrent de ceux impliqués dans l'inhibition de la cytotoxicité (Kubota *et al*; 1999a).

2.1 Propriétés des récepteurs d'activation et signalisation intracellulaire

Lors d'un contact entre une cellule NK et une cellule cible, les cellules NK sont activées par l'entremise de récepteurs d'activation. Le récepteur d'activation des cellules NK le mieux caractérisé à ce jour est le Fc γ RIII. Tel que mentionné à la Section 1.1.1, ce récepteur est nécessaire pour l'ADCC lorsqu'une cellule cible est recouverte d'anticorps. D'autres récepteurs d'activation sont connus. Par exemple, les récepteurs CD2 et 2B4 se lient à CD48 (Kato *et al*; 1992, Brown *et al*; 1998), le récepteur CD94/ NKG2C à Qa-I^b (Vance *et al*; 1999), les récepteurs Ly49D et Ly49P à des molécules du CMH de classe I (Nakamura *et al*; 1999, George *et al*; 1999, Silver *et al*; 2000) et le récepteur NKG2D à H-60 et Rae-1 qui sont deux molécules exprimées sur plusieurs cellules cancéreuses (Diefenbach

et al; 2000). De plus, les récepteurs NKR-P1 et CD69 ont aussi été reconnus comme récepteurs activateurs des cellules NK, mais aucun ligand n'a toutefois été identifié pour ces récepteurs (Karlhofer *et al*; 1991, Moretta *et al*; 1991).

La majorité des récepteurs d'activation ont un domaine cytoplasmique qui ne contient aucun motif de signalisation. Par conséquent, pour permettre la transduction de signaux, ces récepteurs doivent se lier à des protéines adaptatrices comme les chaînes ξ ou γ des récepteurs CD3 et Fc ϵ RI (respectivement) ou à la molécule DAP12. Cette interaction est faite par association de charge dans la région transmembranaire. Les molécules de signalisation contiennent un motif d'activation appelé ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) défini par 17 ou 18 acides aminés centrés sur 2 enchaînements YxxL/I ou un seul YxxL/I dans leur domaine cytoplasmique (Vély & Vivier; 1996). Lors de l'engagement d'un récepteur d'activation avec son ligand, les tyrosines de l'ITAM de la chaîne associée au récepteur sont phosphorylées par des protéines kinases de la famille Src (Tomasello *et al*; 2000). Ensuite, les ITAM phosphorylés recrutent et activent des tyrosines kinases de la famille ZAP-70/Syk (principalement Syk) ce qui a pour conséquence d'activer la cellule NK (Brumbaugh *et al*; 1997, McVicar *et al*; 1998, Yokoyama; 1998, Long; 1999, Lanier; 2000). Lors de l'activation de la cellule NK par ces récepteurs d'activation, la cytotoxicité de la cellule et la production de cytokines augmentent à condition toutefois qu'aucun récepteur inhibiteur n'ait été co-engagé. Donc, le contrôle est principalement exercé au niveau des récepteurs d'inhibition.

2.2 Propriétés des récepteurs d'inhibition et signalisation intracellulaire

Les informations disponibles laissent croire que chaque cellule NK exprimerait au moins un récepteur d'inhibition qui reconnaît une molécule du CMH de classe I du soi. Ainsi, toutes les cellules qui expriment cette molécule à un niveau normal pourraient donc inhiber la cellule NK et survivre. Néanmoins, si, comme mentionné précédemment, une cellule n'exprime aucune molécule du CMH du

soi, exprime une molécule altérée, exprime ces molécules à un niveau inférieur au seuil de reconnaissance ou encore exprime une molécule d'un CMH allogénique qui ne soit pas un ligand des récepteurs d'inhibition exprimés par la cellule NK, l'inhibition n'aura pas lieu. Dans ces cas, à condition toutefois que la cellule NK reçoive un signal d'activation, la cellule cible sera détruite.

Dans une revue récente, le Dr Éric Long (1999) a défini les récepteurs d'inhibition selon trois caractéristiques. D'abord, ces récepteurs inhibent l'activation en *trans*. Ensuite, l'inhibition est exercée par le recrutement d'une phosphatase via un motif dit ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, L/V/IxYxxL/V) (Burshtyn *et al*; 1997, Vély & Vivier; 1997, Vivier & Daeron; 1997). Finalement, l'inhibition peut cibler différentes voies de signalisation activatrices mais nécessite une co-agrégation avec un récepteur d'activation. Cette dernière caractéristique fait en sorte que seuls les récepteurs d'activation coengagés avec des récepteurs d'inhibition seront inhibés. Cette caractéristique explique l'observation qu'une cellule NK peut être en contact avec plus d'une cellule cible, mais en lyser seulement une (Eriksson *et al*; 1999).

La queue cytoplasmique des récepteurs d'inhibition contient un (ou deux) ITIM(s). Ainsi, contrairement aux récepteurs d'activation, les récepteurs d'inhibition n'ont pas besoin de se joindre à une molécule adaptatrice pour être exprimés à la surface et transmettre un signal. L'ITIM est phosphorylé sur la tyrosine centrale, possiblement par des kinases de la famille Src, suite à une liaison entre le récepteur et son ligand (Lanier; 1998). Ensuite, une tyrosine phosphatase (SHP-1, SHP-2) ou l'inositol phosphatase SHIP est recrutée et activée (Olivero *et al*; 1998). Certains résultats ont démontré que la tyrosine phosphatase SHP-1 qui est exprimée seulement dans les cellules du système immunitaire peut déphosphoryler l'ITAM des récepteurs d'activation ainsi que les kinases des familles Src et ZAP-70/Syk et les protéines adaptatrices LAT et SLP-76 (Tomasello *et al*; 2000). Ces changements d'état de phosphorylation ont pour effet d'arrêter la cascade d'activation qui avait été enclenchée dans le voisinage

immédiat du récepteur. Il est à noter que ce serait principalement cette phosphatase qui serait recrutée dans les cellules NK. Les conséquences du recrutement de SHP-2 dans les cellules NK sont peu connues. En effet, il semblerait qu'à l'opposé de SHP-1, cette phosphatase soit impliquée plus particulièrement dans des cascades de signalisation activatrices (Huyer & Alexander; 1999, Qu *et al*; 1999). Toutefois, il est important de noter que SHP-2 est exprimée de façon ubiquitaire et que son rôle puisse être beaucoup plus général que celui de SHP-1 (Olivero *et al*; 1998). Contrairement aux tyrosines phosphatases qui agissent sur des tyrosines phosphorylées, l'inositol phosphatase SHIP altère le recrutement à la membrane de protéine qui y sont activées par le phospholipide (PI)-3,4,5-P₃ en clivant ce phospholipide en PI-3,4-P₂. Ainsi, plusieurs protéines impliquées, entre autres, dans l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et l'activation de la cellule sont inhibées (Krystal *et al*; 2000). Cette phosphatase serait toutefois principalement recrutée par les ITIM présents sur les récepteurs des lymphocytes T et B (Krystal *et al*; 2000).

2.3 Familles des récepteurs d'activation et d'inhibition

Les récepteurs d'activation et d'inhibition sont divisés en deux grands groupes : ceux qui appartiennent à la superfamille des Ig et ceux qui s'apparentent aux lectines de type C.

2.3.1 Superfamille des immunoglobulines

Les récepteurs NK de la superfamille des Ig se retrouvent sur une gamme de cellules majoritairement chez l'homme (Wagtmann *et al*; 1995, Colonna & Samaridis; 1995, Rojo *et al*; 1997). Ce sont des protéines transmembranaires de type I qui ont un nombre variable de domaines Ig et qui sont codées par des gènes polymorphiques (Uhrberg *et al*; 1997). Ceci a inspiré leur nom KIR (killer Ig-like receptor) (Long; 1999). Les récepteurs KIR se lient à des molécules du CMH de classe I et peuvent transmettre un signal d'inhibition ou d'activation

selon le récepteur engagé (Long *et al*; 1997). Les récepteurs d'inhibition de ce groupe ont une queue cytoplasmique plus longue que leurs partenaires activateurs, car celle-ci contient deux ITIMs. Ces motifs recrutent la phosphatase SHP-1 lorsque le récepteur est engagé par son ligand et un signal d'inhibition de la cytotoxicité est transmis à la cellule NK (Binstadt *et al*; 1996).

Les molécules d'activation quant à elles doivent se lier à la molécule DAP12 pour transmettre un signal, car ces récepteurs ont une queue cytoplasmique réduite qui ne contient aucun motif de transduction (Olcese *et al*; 1997). Ainsi, lorsqu'un tel récepteur se lie à son ligand, l'activation de la cellule suivra à condition toutefois qu'aucun récepteur d'inhibition n'ait été engagé dans son entourage immédiat.

2.3.2 Superfamille des lectines de type C

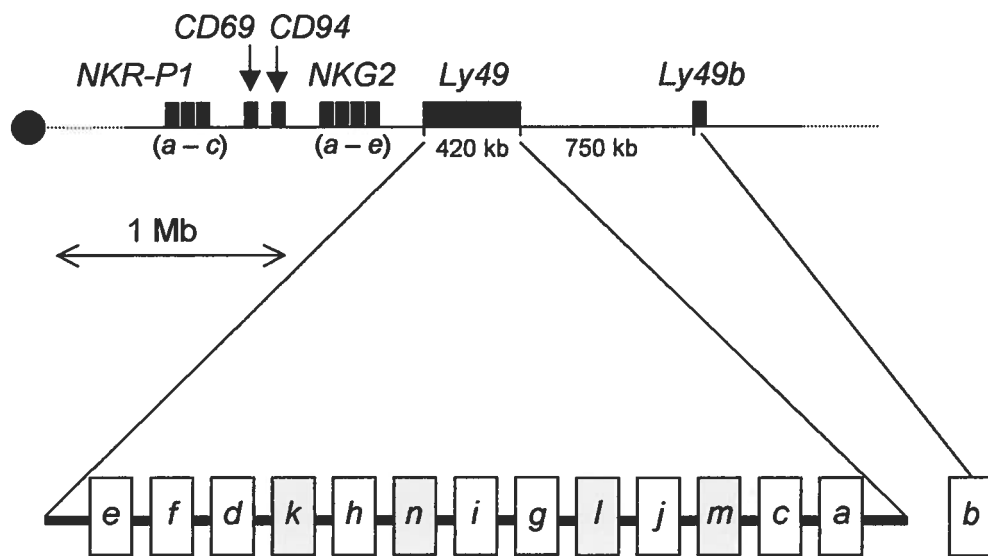
Les récepteurs de la superfamille des lectines de type C sont des protéines transmembranaires de type II codées aussi par des gènes polymorphiques (Yokoyama; 1998). Chez la souris, les gènes codant pour ces récepteurs régulateurs de l'activité NK se retrouvent principalement sur le chromosome 6 dans le complexe des gènes NK (Figure 1). Le complexe des gènes NK a une longueur d'environ 4 Mb et il contient plusieurs groupes de récepteurs d'activation et d'inhibition (Brown *et al*; 1997, Brown *et al*; 1999, Dépatie *et al*; 2000). Ces récepteurs définissent des sous-populations chevauchantes de cellules NK et ils ne sont pas tous présents chez toutes les souches de souris. Nous en discuterons dans l'ordre de leur position chromosomique par rapport au centromère.

Trois protéines NKR-P1 ont été clonées chez la souris et le rat, mais seulement une chez l'humain (Giorda *et al*; 1990, Giorda *et al*; 1991, Yokoyama *et al*; 1991, Giorda *et al*; 1992, Ryan *et al*; 1992, Lanier *et al*; 1994). Ces molécules se présentent à la surface de la majorité des cellules NK et sur une sous-population

Figure 1 : Complexe des gènes NK murin

D'après Brown et collaborateurs (1997, 1999), McQueen et collaborateurs (1998), Dépatie et collaborateurs (2000) et Makrigiannis et Anderson (2001b)

Le complexe des gènes NK illustré est celui de la souris C57BL/6 car il est le mieux caractérisé. Cette région du chromosome 6 code pour plusieurs récepteurs régulateurs de l'activité fonctionnelle des cellules NK. Les gènes dans les boîtes grises sont considérés être des pseudogènes non exprimés chez la souris C57BL/6.



de cellule T, sous forme homodimérique dont les chaînes sont liées par des ponts disulfures (Lanier; 1998). Les récepteurs NKR-P1A du rat et NKR-P1C de souris ont une fonction activatrice tandis que le récepteur NKR-P1B aurait quant à lui une activité inhibitrice (Karlhofer *et al*; 1991, Ryan *et al*; 1995, Carlyle *et al*, 1999, Kung *et al*; 1999). Il est à noter que le gène *NKR-P1c*, code pour l'antigène NK1.1, le marqueur qui identifie la majorité des cellules NK chez la souris C57BL/6 (Glimcher *et al*; 1977). Cependant, ces récepteurs ne sont pas essentiels aux cellules NK, car certaines souches de souris (ex : BALB/c) qui n'expriment aucun de ces récepteurs ont un nombre normal de cellules NK actives (Giorda *et al*; 1992). À ce jour, aucun ligand physiologique des récepteurs NKR-P1 murins n'a été identifié. Le récepteur CD69 est une protéine transmembranaire de type II. Ce récepteur d'activation est exprimé sur tous les leucocytes activés. Par ailleurs, son spectre d'expression très large suggère un rôle général dans la biologie des cellules hématopoïétiques (Testi *et al*; 1994).

Cette superfamille contient aussi les protéines NKG2A, C et E qui sont exprimées à la surface des cellules NK des humains, des rats et des souris en hétérodimère avec la chaîne invariante CD94 (Houchins *et al*; 1991, Berg *et al*; 1998, Lohwasser *et al*; 1999, Silver *et al*; 1999). Cette association permet l'expression de ces molécules activatrices et inhibitrices à la surface de la cellule (Vance *et al*; 1998). Chez la souris, ces récepteurs reconnaissent tous la molécule du CMH de classe Ib Qa-I^b (Vance *et al*; 1998, Vance *et al*; 1999). Le récepteur d'activation NKG2D, quant à lui, forme un homodimère et se lie à la molécule DAP10. Il a pour ligands les molécules H-60 et Rae-1 qui sont apparentées aux CMH de classe I, mais qui sont exprimés à la hausse que sur les cellules cancéreuse (Diefenbach *et al*; 2000). Lorsqu'un récepteur d'activation (CD94/NKG2C ou E) de cette famille entre en contact avec son ligand, il y a activation de la cellule NK via la molécule DAP12 (Lanier *et al*; 1998). Toutefois, si le CD94/NKG2A rencontre le ligand Qa-I^b, la cellule NK reste inactive. Le rôle des récepteurs se liant à Qa-I^b n'est pas bien défini, mais une étude récente suggère que ceux-ci aient un rôle important lors du développement des cellules NK (Salcedo *et al*;

2000). Plus particulièrement, cette étude propose que l'expression de récepteurs d'inhibition se liant à Qa-I^b aide à maintenir la tolérance des cellules NK par rapport aux cellules du soi pendant les premières semaines de vie. Pour l'instant, ce rôle pourrait être attribué au complexe CD94/NKG2A, mais des études plus approfondies pourraient peut-être mener à la découverte d'autres récepteurs d'inhibition pouvant se lier à Qa-I^b. Ces récepteurs sont aussi exprimés sur les cellules précurseurs des cellules NK : les cellules NK1.1⁻ IL-2/15R β ⁺ (Williams *et al*; 2000).

La superfamille des lectines de type C comprend aussi la famille des récepteurs Ly49. À ce jour, les récepteurs Ly49A à Ly49W ont été clonés chez différentes souches de souris (Yokoyama *et al*; 1990, Wong *et al*; 1991, Smith *et al*; 1994, Brennan *et al*; 1994, McQueen *et al*; 1998, Makriganis *et al*; 1999, Makriganis *et al*; 2000, Silver *et al*; 2001). Il est peu probable que chaque gène qui code pour un récepteur Ly49 soit présent chez toutes les souches de souris. Chez la souris C57BL/6, 14 gènes Ly49 ont été positionnés dans le complexe des gènes NK soit les *Ly49a* à *Ly49n*. Parmi ceux-ci, 13 se retrouvent sur une distance de seulement 420 kilobases (kb) (Brown *et al*; 1997, McQueen *et al*; 1998, Brown *et al*; 1999, Dépatie *et al*; 2000). Selon Dépatie et collaborateurs (2000), tenant compte de la taille des gènes clonés et de la longueur de la région Ly49, celle-ci pourrait inclure d'autres gènes du groupe Ly49. Ainsi, une étude plus approfondie de cette région pourrait permettre la localisation des gènes *Ly49o* à *Ly49w*. Le gène *Ly49b* pour sa part a été localisé à 750 kb du groupe Ly49 (Brown *et al*; 1999, Dépatie *et al*; 2000). Pour l'instant, il est le seul gène Ly49 qui soit situé à l'extérieur du groupe. Toutefois, il est possible qu'il fasse partie d'une sous-classe de récepteurs Ly49 dont les autres membres n'ont pas encore été identifiés. Contrairement à cette grande quantité de récepteurs clonés chez la souris, seulement 3 récepteurs Ly49 ont été clonés chez le rat (Ly49.9, Ly49.12 et Ly49.29) et seulement un pseudogène Ly49 a été cloné chez l'humain (Dissen *et al*; 1996, Bull *et al*; 2000). Pour l'instant, il semble que ces récepteurs soient exprimés en homodimères, mais on ne peut exclure avec certitude qu'aucune

forme hétérodimérique ne pourrait exister (Brennan *et al*; 1996a). L'étude qui a mené à cette conclusion a été faite en ne considérant que Ly49A et Ly49C, deux récepteurs qui dont l'homologie n'est que de 64% alors qu'elle peut atteindre 97% pour d'autres récepteurs plus apparentés (Takei *et al*; 2001). On ne peut écarter la possibilité que des chaînes polypeptides plus homologues puissent s'associer et que des hétérodimères Ly49 puissent être exprimés. Puisque le récepteur concerné par ce mémoire fait partie de cette famille, celle-ci sera discutée plus en détail dans la Section suivante.

3. Famille des récepteurs Ly49

3.1 Classification

À ce jour, 23 récepteurs Ly49 ont été identifiés chez la souris et ce nombre ne cesse de croître. Cependant, il est à noter que les récepteurs Ly49K et Ly49N n'ont pas été clonés au complet et qu'il semblerait que ces récepteurs ne soient pas exprimés (McQueen *et al*; 1999). En outre, les récepteurs Ly49L et Ly49M ne semblent pas exprimés chez la souris C57BL/6 (Makrigiannis *et al*; 2001b). Dans le Tableau 1, les récepteurs Ly49 ont été classés selon deux critères. D'abord selon la présence ou l'absence d'un ITIM dans leur domaine cytoplasmique. Sur cette base, la famille des Ly49 contiendrait 13 récepteurs potentiellement inhibiteurs et 8 récepteurs potentiellement activateurs. Pour tous les récepteurs sans ITIM qui ont pu être caractérisés à ce jour, il a été établi que ceux-ci doivent se lier à la molécule de signalisation DAP12 pour pouvoir transmettre un signal (Smith *et al*; 1998, Gosselin *et al*; 1999, Makrigiannis *et al*; 1999, Makrigiannis *et al*; 2000, Silver *et al*; 2001). Puis, ils ont été classés selon l'homologie de leur séquence avec les récepteurs prototypes Ly49A et Ly49C. En effet, l'analyse des séquences protéiques des Ly49 a démontré que la majorité des récepteurs Ly49 s'apparentent soit à la séquence du Ly49A soit à celle du Ly49C (Held *et al*; 1999, Takei *et al*; 2001). Néanmoins, l'homologie entre les deux groupes n'est pas négligeable, car la séquence protéique du récepteur

Tableau 1 : Classification des récepteurs Ly49

Ly49	A	B	C	D	E	F	G2	H	I	J	L
ITIM	*	*	*		*	*	*		*	*	
Groupe Ly49A-like	•			•			•				•
Groupe Ly49C-like			•		•	•		•	•	•	

Ly49	M	O	P	Q	R	S	T	U	V	W
ITIM		*		*		*	*		*	
Groupe Ly49A-like	•	•	•	•	•		•		•	•
Groupe Ly49C-like						•		•		

Selon Held et collaborateurs (1999), Takei et collaborateurs (2001) et le logiciel « Blast Search » de la base de donnée du NCBI

Dans ce tableau, les récepteurs Ly49 sont d'abord classés selon la présence ou l'absence d'un ITIM. Seuls les récepteurs Ly49 qui possèdent un ITIM dans leur domaine cytoplasmique sont potentiellement inhibiteurs. Puis, les récepteurs Ly49 sont divisés en deux groupes selon l'homologie de leur séquence avec les récepteurs prototypes Ly49A et Ly49C. Il est à noter qu'à l'intérieur du groupe de type Ly49A, il semble y avoir le sous-groupe des récepteurs de type Ly49G2, qui inclut les récepteurs Ly49L, Q, T et W dont au moins deux ne seraient pas des récepteurs inhibiteurs.

Les récepteurs Ly49K et Ly49N ont été exclus de ce Tableau, car ils sont codés par des pseudogènes (McQueen *et al*; 1999).

Ly49C montre une identité de 64% avec celle du récepteur Ly49A (Wong *et al*; 1991). Le Ly49B pour sa part ne peut être classé dans aucun des deux sous-groupes, car plus de 38% des acides aminés de son domaine extracellulaire sont uniques à ce récepteur. L'utilité d'un si grand nombre de récepteurs homologues est ambiguë. Si la fonction et les ligands de plusieurs récepteurs n'ont pas été déterminés, on sait par ailleurs que plusieurs ont la capacité de se lier à un même ligand. On peut donc s'attendre à une certaine redondance dans leurs fonctions.

3.2 Expression cellulaire

Les cellules NK représentent une population très hétérogène principalement en ce qui a trait à l'expression des récepteurs Ly49. En effet, différents récepteurs Ly49 sont exprimés sur des sous-populations de cellules NK qui se chevauchent partiellement (Brennan *et al*; 1994, Kubota *et al*; 1999b, Ortaldo *et al*; 1999, Takei *et al*; 2001). De plus, chez la souris certains récepteurs inhibiteurs de cette famille ont aussi été retrouvés à la surface des cellules NKT (Bendelac *et al*; 1997). L'analyse des cellules NK est complexe, car chacune peut exprimer plus d'un récepteur et chacun de ceux-ci peut généralement se lier à plusieurs molécules du CMH de classe I et de surcroît chacune de ces molécules peut être reconnue par plus d'un récepteur. L'analyse de plusieurs souches de souris a de plus démontré que l'expression des récepteurs Ly49 diffère d'une souche de souris à l'autre (Tableau 2). Par exemple, le gène codant pour le récepteur Ly49M est transcrit chez la souris NOD, mais la présence d'un codon stop au début de l'exon 4 empêche son expression chez la souris C57BL/6 (Silver *et al*; 2001). De plus, les récepteurs Ly49L, Ly49O, Ly49P et Ly49R à Ly49W ne semblent pas non plus être exprimés chez la souris C57BL/6 (Makrigiannis *et al*; 1999, Makrigiannis *et al*; 2000, Makrigiannis *et al*; 2001a, Silver *et al*; 2001). Cependant, l'absence de ces récepteurs chez cette souris n'a pas encore été reliée à une mutation ponctuelle ou une délétion du gène. Des études génétiques plus approfondies seront donc nécessaires pour éclaircir les modalités de régulation de l'expression ou de la suppression des récepteurs chez les

Tableau 2: Présence des récepteurs Ly49 chez différentes souches de souris

Ly49	A	B	C	D	E	F	G2	H	I	J	L
C57BL/6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BALB/c	+	+	+				+				+
CBA/J	+	+	+	-			+	-			+
129/J	-				+		+		+		-
129/SvJ		+									
NOD/NOR	+			+			+				
C3H			+				+				+
A/J			+								
A/Sn			+								
NZB								+			

Ly49	M	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	W
C57BL/6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
BALB/c											
CBA/J			-								
129/J		+	+		+	+	+	+	+		
129/SvJ											
NOD/NOR	+		+							+	+
C3H											
A/J											
A/Sn											
NZB											

D'après Makrigiannis et collaborateurs (2000 et 2001), Silver et collaborateurs (2001) et la base de donnée du NCBI

Il y a une très grande diversité dans l'expression des récepteurs Ly49 entre les souches de souris. (+) gène exprimé ou intact, (-) gène non-fonctionnel ou silencieux, () information non disponible

Les récepteurs Ly49K et Ly49N ont été exclus de ce Tableau, car ils sont codés par des pseudogènes (McQueen *et al*; 1999).

différentes souches de souris. Ces études pourraient aussi nous donner des informations précieuses sur l'existence des différents allèles des récepteurs Ly49, car pour l'instant seuls certains allèles ont été identifiés. La présence ou l'absence des récepteurs Ly49 chez différentes souches de souris n'est pas la seule cause de l'hétérogénéité des cellules NK. En effet, les niveaux d'expression et le nombre de cellules qui expriment chaque récepteur varient aussi d'une souche de souris à l'autre (Gosselin *et al*; 1997, Corral *et al*; 1999, Ortaldo *et al*; 1999). Ceci s'explique entre autres par le fait que le niveau d'expression d'un récepteur Ly49 peut être influencé par la présence de son ligand (Hoglund *et al*; 1997). En effet, lorsqu'un récepteur Ly49 a un niveau d'expression bas ou une faible affinité pour un ligand donné, il a besoin d'un niveau de ligand plus élevé pour atteindre le seuil d'avidité nécessaire pour transmettre un signal. Cette observation a mené à la théorie de la calibration des récepteurs (Sentman *et al*; 1995). Selon cette théorie, les cellules NK présentant un niveau réduit de récepteurs ont une meilleure capacité pour détecter les cellules cibles qui expriment de faibles niveaux de ligands. Ainsi, l'expression réduite du récepteur Ly49 imposé par la présence du ligand chez l'hôte a converti la cellule NK en un outil de surveillance des cellules du soi plus utile pour détecter et trouver les cellules qui expriment un niveau réduit de molécule du CMH de classe I. C'est notamment le cas de bon nombre de cellules tumorales et de cellules infectées par un virus.

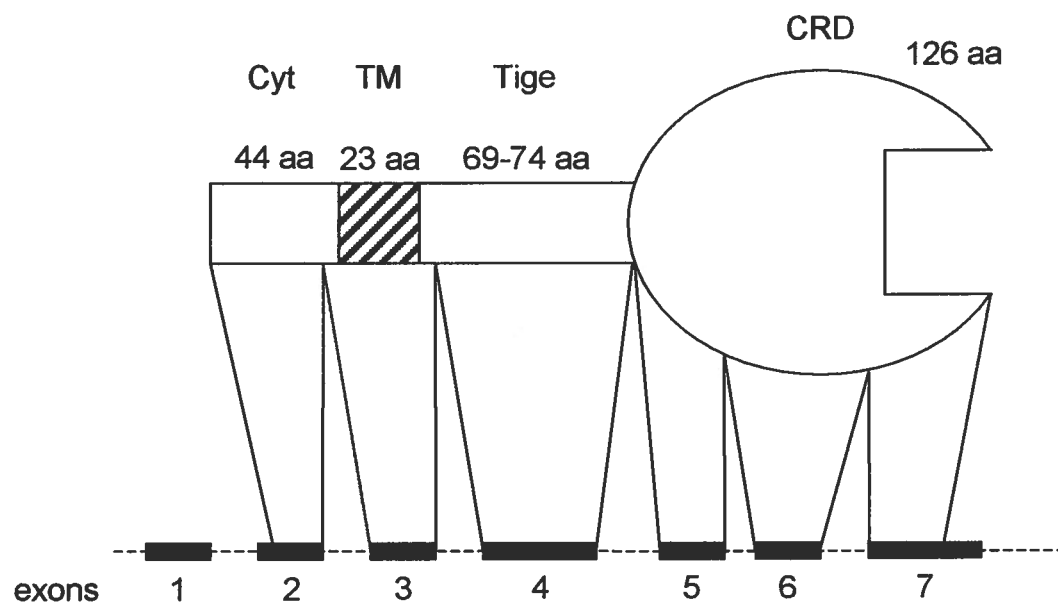
3.3 Structure

La structure d'un récepteur Ly49 peut être divisée en quatre parties (Figure 2) (Kubo *et al*; 1993, Takei *et al*; 1997). La queue cytoplasmique codée par une partie de l'exon 2 comprend ou non un ITIM et a une longueur de 44 acides aminés. Le domaine transmembranaire dans lequel un acide aminé chargé positivement est présent dans le cas d'un récepteur d'activation compte 23 acides aminés et est majoritairement codé par l'exon 3. La tige codée par l'exon 4 comprend entre 69 et 74 acides aminés selon le récepteur. Finalement, le CRD (carbohydrate recognition domain) est codé par les exons 5, 6 et 7 et contient

Figure 2: Structure des récepteurs Ly49

D'après Takei et collaborateurs (1997)

Les récepteurs Ly49 sont constitués de 4 parties: le domaine cytoplasmique (cyt), le domaine transmembranaire (TM), la tige et le CRD. Chacun est codé par un ou plusieurs exon(s).



126 acides aminés, sauf pour le récepteur Ly49B qui possède une extension de 20 acides aminés supplémentaires à son extrémité carboxyterminale.

3.4 Ligands

Tous les ligands connus des récepteurs Ly49 sont des molécules du CMH de classe I. Cependant, les ligands de moins de la moitié des récepteurs Ly49 (Ly49A, C, D, G2, I, O, P, R, V et W) ont été identifiés. La spécificité de ces récepteurs Ly49 a pu être déterminée par une combinaison de techniques incluant, entre autres, des études de cytométrie en flux à l'aide de tétramères de molécule du CMH de classe I (Hanke *et al*; 1999, Michaëlsson *et al*; 2000, Makrigiannis *et al*; 2001a), des tests de cytotoxicité (Karlhofer *et al*; 1992, Johansson *et al*; 1998, Franksson *et al*; 1999, Su *et al*; 1999, Silver *et al*; 2000, Silver *et al*; 2001) et des études d'adhésion cellulaire de cellules transfectées avec l'ADNc d'un récepteur à des cellules transfectées avec l'ADNc d'un ligand (Hanke *et al*; 1999, Lian *et al*; 1999). Les études de spécificité des récepteurs Ly49 ont mené à plusieurs résultats contradictoires. En effet, il est difficile de consolider tous ces résultats en un modèle unique qui définirait l'interaction récepteur/ligand. Il semble plutôt que plusieurs lois gouvernent ces liaisons. Par exemple, il est vraisemblable qu'un seuil de liaison doive être atteint pour que celle-ci soit fonctionnelle et ainsi que certaines des liaisons identifiées à ce jour ne génèrent pas de signal. Un nouveau système d'étude d'interaction entre les récepteurs et leurs ligands a été mis au point dans notre laboratoire et permettra de confirmer la fonctionnalité de certaines de ces liaisons (Chalifour *et al*; manuscrit soumis pour publication).

Des résultats inattendus ont été obtenus, notamment, lors de l'étude du rôle de la tige et du CRD des récepteurs Ly49 dans la liaison avec une molécule du CMH de classe I. En effet, il avait préalablement été établi que le CRD des récepteurs Ly49 était impliqué dans la liaison avec le ligand. Or, il a été démontré que dans le cas du récepteur Ly49C, la tige et le CRD étaient impliqués dans cette interaction (Brennan *et al*; 1996a, Chalifour *et al*; manuscrit soumis pour

publication). Cependant, la détermination de la structure cristallographique du CRD de Ly49A lié à H-2D^d a permis d'identifier deux sites d'interaction entre le CRD et ce ligand (Tormo *et al*; 1999). Ainsi, dans le cas du Ly49A, la tige ne serait pas nécessaire à la liaison Ly49/CMH, car elle était absente dans cette étude, mais la tige pourrait toutefois être requise pour que l'interaction entre les deux molécules soit fonctionnelle. Il serait donc intéressant que des études fonctionnelles du rôle de la tige et du CRD soient faites pour d'autres récepteurs Ly49 afin de déterminer si toutes les liaisons récepteur/ligand sont identiques sur ce plan. Cependant, l'absence d'anticorps monoclonaux (AcMo) que se lient à la tige des récepteurs est un handicap majeur au succès d'une telle analyse, car on ne peut les utiliser pour bloquer l'interaction récepteur/ligand.

Un autre fait qui laisse croire à une hétérogénéité des liaisons Ly49/CMH a été rapporté par Nakamura et collaborateurs (2000). Rappelons d'abord que le récepteur Ly49A est une protéine inhibitrice et que le récepteur Ly49D donne un signal activateur à la cellule NK. Toutefois, malgré leur différence fonctionnelle, ces deux récepteurs se lient au même ligand : la molécule du CMH de classe I H-2D^d. Leur étude suggère que les différents récepteurs Ly49 se lient aux ligands de différentes façons, car une seule mutation ponctuelle dans les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de H-2D^d est suffisante pour inhiber l'interaction Ly49D/H-2D^d, mais une combinaison de mutations dans le domaine $\alpha 2$ de ce ligand est nécessaire pour éliminer l'interaction de H-2D^d avec le récepteur Ly49A. Néanmoins, une interprétation alternative pourrait être que comme le Ly49A a une affinité intrinsèque pour H-2D^d plus grande que celle de Ly49D, ce récepteur serait dès lors moins sensible aux mutations ponctuelles de son ligand. Pourtant, au plan physiologique ceci ne serait pas avantageux, car l'induction de mutations dans une molécule du CMH de classe I est un processus d'échappement à l'action du système immunitaire qui est couramment utilisé par les virus.

L'étude du rôle du calcium dans les interactions récepteur/ligand a mené à des résultats intéressants. Généralement, le domaine CRD des lectines de type C lie

les sucres de façon dépendante du calcium (Weis *et al*; 1998). Cependant, le CRD que l'on retrouve chez les récepteurs Ly49 est dépourvu de certains acides aminés essentiels pour la liaison au calcium. Ainsi, les récepteurs Ly49 ne seraient théoriquement pas capables de lier les sucres de façon dépendante du calcium. Ceci a été confirmé, entre autres, par une étude de la liaison de Ly49A à son ligand H-2D^d en absence de calcium (Natarajan *et al*; 1999). C'est pour cette raison que dorénavant ces récepteurs sont plutôt dits apparentés aux lectines de type C.

Les études qui ont porté sur le rôle des sucres dans la liaison Ly49/CMH de classe I sont contradictoires (Takei *et al*; 1997). En effet, le rôle de la glycosylation des ligands a été examiné après avoir remarqué que les récepteurs Ly49 ont une structure qui s'apparente aux lectines et que les récepteurs Ly49A et Ly49C peuvent se lier au sucre fucoïdine sulfaté *in vitro* (Daniels *et al*; 1994, Brennan *et al*; 1995). Cependant, il est à noter que ces sucres non-physiologiques ne peuvent entrer en contact avec des récepteurs NK *in vivo*. De plus, ces études ont souligné que des inhibiteurs de glycosylation et des glycosidases inhibent la protection des cellules cibles. Cependant, lorsque les sites de N-glycosylation de H-2D^d ont été mutés, aucun effet n'a été observé sur la protection de la cellule cible par l'interaction Ly49A/H-2D^d (Matsumoto *et al*; 1998). Finalement, plusieurs études de liaisons ont été effectuées avec des tétramères non-glycosylés produits chez les bactéries et plusieurs liaisons récepteur/ligand ont été identifiées avec ce système (Hanke *et al*; 1999, Natarajan *et al*; 1999, Michaëlsson *et al*; 2000). Ainsi, les résultats publiés à ce jour certifient que les sucres ne sont pas requis pour la liaison des récepteurs Ly49 à la plupart des molécules du CMH de classe I. Toutefois, il est toujours possible que les sucres altèrent l'affinité ou la spécificité des interactions. D'autres études devront donc être effectuées pour déterminer si la présence de sucres sur les molécules du CMH de classe I est essentielle, nécessaire mais pas suffisante ou inutile pour la reconnaissance spécifique, de forte affinité et fonctionnelle de ces molécules par les récepteurs Ly49.

Finalement, le rôle du peptide dans les interactions des récepteurs Ly49 avec leurs ligands est un bel exemple de l'hétérogénéité de telle liaisons. Il y a quelques années, tous les spécialistes étaient convaincus que la reconnaissance d'une molécule du CMH de classe I par une cellule NK était indépendante de la nature du peptide présenté, en autant que celui-ci stabilise l'expression d'une molécule du CMH à la surface de la cellule. Cependant, il a été démontré, chez l'homme, que la reconnaissance d'une molécule du CMH de classe I par le récepteur de la superfamille des Ig, p70 (KIR-11) est dépendante de la nature du peptide. Ainsi, seulement une minorité des peptides qui peuvent stabiliser le ligand HLA B2705 protègent la cellule cible (Peruzzi *et al*; 1996a, Peruzzi *et al*; 1996b). De plus, dans ce système humain, les récepteurs p58 (KIR2DL1, L2 et L3) qui protègent les cellules cibles exprimant des allèles HLA-C peuvent reconnaître ces molécules même si aucun peptide n'est présent (Mandelboim *et al*; 1996). Dans le système murin, plusieurs scénarios ont aussi été rapportés. Dans le cas du récepteur Ly49A, aucune sélectivité n'a été identifiée car une variété de peptides qui stabilisent H-2D^d permettent la protection de la cellule cible (Correa & Raulet; 1995, Orihuela *et al*; 1996). Cependant, deux études faites avec le récepteur Ly49C et le ligand H-2K^b démontrent une spécificité dépendante de la nature du peptide (Franksson *et al*; 1999, Michaëlsson *et al*; 2000). Pourtant, une autre étude a montré que ce récepteur n'a aucune ou peu de capacité à distinguer les peptides présentés par deux autres ligands H-2K^d et H-2D^b (Hanke *et al*; 1999). Finalement, cette même étude a aussi établi une relation entre la nature de peptide lié à H-2K^d et la liaison au récepteur Ly49I.

Il semble donc que sans égard à l'espèce (humain ou souris) ou à la famille du récepteur, certains récepteurs ont un besoin sélectif de peptides et d'autres non. De plus, dans le cas du récepteur Ly49C, ce besoin dépend aussi de la nature du ligand. Il reste à déterminer si cela fait en sorte que les récepteurs des cellules NK soient plus sensibles aux changements quantitatifs et qualitatifs des molécules du CMH de classe I.

3.5 Caractéristiques particulières du récepteur Ly49B

Bien que le rôle et les caractéristiques d'un certain nombre de récepteurs Ly49 commencent à être bien définis, la majorité d'entre eux n'ont pas encore été caractérisés en profondeur. Le récepteur Ly49B est le deuxième Ly49 qui a été cloné (Wong *et al*; 1991) et depuis ce temps, plusieurs autres récepteurs Ly49 ont été trouvés. Malgré tout, à ce jour peu de résultats ont été publiés concernant ce récepteur particulier.

L'étude de sa localisation chromosomique et de sa séquence laisse croire que le récepteur Ly49B fait bande à part. Le gène qui code pour cette protéine se trouve en effet tout à fait isolé des autres membres de la famille en position télomérique du groupe dans le complexe des gènes NK (Figure 1). Cependant, il est possible qu'il fasse partie d'un groupe distinct dont les autres membres qui sont à découvrir s'apparenteraient au récepteur Ly49B.

L'examen de la séquence protéique du récepteur Ly49B ne laisse pas non plus de doute quant à son individualité (Figure 3). Rappelons d'abord que ce récepteur est le seul Ly49 à avoir une séquence supplémentaire de 20 acides aminés à la fin de son CRD. Cependant, le rôle de cette extension carboxyterminale n'a jamais été défini. De plus, la séquence en acides aminés du récepteur Ly49B ne présente en moyenne que 48% d'identité avec tous les autres récepteurs Ly49 clonés et plusieurs différences pourraient avoir un impact majeur sur la fonction de ce récepteur. Par exemple, les acides aminés marqués d'un **X** à la Figure 3 identifient des changements importants dans la séquence de ce récepteur par rapport aux séquences consensus. Certaines de ces différences mènent à des changements, pertes ou addition de charges à des positions où les acides aminés sont normalement conservés chez presque tous les récepteurs Ly49 de souris et rat. Un autre changement important est la perte de deux résidus tryptophane d'une séquence WxW dans le CRD, un acide aminé dont la présence est souvent liée à la fonction de la protéine. Ainsi, la structure des lectines de type C dépend de certains résidus tryptophane qui sont, entre autres,

Figure 3 : Comparaison des séquences consensus des groupes Ly49A, Ly49C et du rat avec la séquence du Ly49B

D'après les séquences disponibles dans la base de donnée du NCBI et Tormo et collaborateurs (1999)

Lorsque deux lettres sont inscrites dans la séquence consensus, la première est la plus commune.

Code: aa en rose : conservés chez tous les récepteurs Ly49 murins et non chez le rat

aa en vert : conservés chez tous les récepteurs Ly49 de souris et de rat

aa en bleu : seulement un récepteur Ly49 déroge du consensus représenté par la première des deux lettres

aa encadrés d'orange : conservés chez toutes les lectines de type C

aa encadrés de noir : ITIM

aa soulignés de noir : domaine transmembranaire

aa soulignés de rouge : séquences cibles uniques au récepteur Ly49B

boîte verte : aa (acide aminé) unique au récepteur Ly49B à cette position

boîte orange : site potentiel de N-glycosylation

boîte rose : régions ou aa potentiellement impliqué dans la liaison au ligand d'après les observations concernant la liaison Ly49A/H-2D^d

Beta X, alpha X et boucle X : régions correspondant à la présence de feuillet β , hélices α ou boucles selon la structure secondaire déterminée pour le récepteur Ly49A

X : illustre des changements importants dans la séquence du récepteur Ly49B par rapport aux séquences consensus

Note : La séquence du récepteur Ly49B identifiée chez les souris BALB/c et CBA/J a été utilisée pour l'élaboration de cette figure.

Domaine cytoplasmique (exon 2)																																32																	
Groupe A	M	S	T	E	Q	E	K	V	D	T	Y	F	S	V	M	R	F	H	Q	K	E	S	T	S	A	G	R	L	Q	K	N	V	M	R	E	K	E	D	PS										
Groupe C	M			E		E	V	T	A	Y	F	S	P	T	V	M	R	N	L	F	H	K	S	S	G	R	L	Q	N	Q	L	V	R	S	H	L	E	T	TI	Q	E	G	R	P	S	R	G		
Rat	M			E		Q				S							R	F		K	S						L	Q																					
Ly49B	M	S	E	Q	E	V	T	Y	T	T	L	L	L	L			R	F	H	K	S	S	G	L			L	Q	N	P	V	R	P	E	E	T	Q	R	P	R									
consensus																																																	

		(exon 3)	Domaine transmembranaire										64
consensus	EK A	RK CY S	WL	LF I V I A	G I LF CI	L LR L V	V	VL L					
Groupe A	EKAV G	R KV C S	W Q L IT V	AS L G I LF C FS LV LR L VI TI	V	A V LF							
Groupe C	A G	R C		A L G I									
Rat	D V G	H R E C S	V P W K F I V I V L G	L C F L L L T	T	A V L							
Ly49B													

Tige (exon 4)																96
Groupe A	IT	IL	QI			QN	KN		LC	E	L	NKHC	NDNK C	S	MT T	Q SN D IV
Groupe C	K IF	F Q Y			Q H	KN	H	E I NH	TP	E TP	L N HY	H N CF	S N M •	Q SR DA FI		
Rat	V I F Q Y S				Q K H	K		L Q E		E	N H N	H N S	M •	Q D I		
Ly49B	V I H I F R D G				Q K H	K	E K	Q E K T		X	L N L R Q E Y Q V M	K N D S	X	BT	X	BT2
consensus																

	consensus	128
Groupe A	NK LA KM	
Groupe C	NK L K E	RI WL YC
Rat	L K E	R WGDY
Ly49B	S L M E	R C L

		CRD (exon 5)										Beta 0		Beta 1																	
Groupe A	KE	T	K	R	T	S	DN	SL	Q	K	H	TP	G	R	G	S	KE	YH	W	F	C	Y	G	K	C	Y	Y	FL	160		
Groupe C	S	E	K	T	KN	TS	DH	S	ST	R	Q	DN	T	G	G	V	K	YH	W	F	C	Y	T	T	K	C	YF	Y	F	I	
Rat	K	T	K				S	S	S	H			G	G		E		W	F	C	Y	G	I	K	C	Y	Y	Y	I		
Ly49B	R	K	T	K	I		V	L	D	C	S	Q	N	K	G	K	Q	V	E	G	Y	W	F	C	G	M	Y	Y	F	I	

Alpha 1		Alpha 2 (exon 6)										192																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
consensus																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												</

responsables de la formation du site de liaison au calcium (Weis *et al*; 1998). Cet effet sur la structure a aussi été observé chez la protéine antithrombine III (Shah *et al*; 1990). De plus, il a été démontré récemment que les résidus tryptophane présents dans le module de liaison des sucres de la xylanase 10A de *Cellulomonas fimi* sont essentiels pour la liaison à la cellulose (McLean *et al*; 2000). Ceci est très intéressant car cela donne un exemple de liaison protéine/sucre via les résidus tryptophane et étant donné qu'il est possible que certains des récepteurs Ly49 se lient à des sucres présents sur leurs ligands, l'absence du motif conservé WxW chez le récepteur Ly49B pourrait indiquer un rôle différent de ce récepteur par rapport aux autres récepteurs Ly49. Finalement, le récepteur Ly49B est le seul Ly49 inhibiteur qui contient l'ITIM VxYxxL. Tous les autres récepteurs Ly49 inhibiteurs utilisent le motif VxYxxV. La signification de cette différence n'a pas été déterminée, mais elle est probablement sans importance vu que les acides aminés valine et leucine sont similaires. Les variations les plus importantes dans la séquence du récepteurs Ly49B par rapport aux autres membres de la famille sont dans la portion extracellulaire du récepteur au niveau de la tige comme du CRD (Figure 3). Outre l'extension carboxyterminale déjà mentionnée, on trouve notamment des séquences de 8 à 10 acides aminés qui n'ont aucune homologie avec aucun des autres récepteurs Ly49.

Malgré ses particularités, il n'y a aucun doute que ce gène code pour un récepteur Ly49, car la majorité des acides aminés qui sont consensus chez les récepteurs Ly49 des groupes A, C et du rat se retrouvent aussi chez le Ly49B (lettres en vert dans la Figure 3). De plus, tous les acides aminés qui sont consensus chez les Ly49 murins (sauf un) ou conservés parmi toutes les lectines de type C sont aussi chez le Ly49B (respectivement en rose ou encadré en orange à la Figure 3). Les séquences consensus WFCxxxKCYYFIM de l'exon 5 et EDELKFL de l'exon 6 sont également présentes chez le Ly49B comme le sont 10 des 11 cystéines présentes dans la portion extracellulaire de la quasi-totalité des autres récepteurs Ly49 murins. Nonobstant, l'extension de 20 acides aminés

de l'extrémité carboxyterminale, la séquence en acides aminés du récepteur Ly49B suggère une structure analogue à celle des autres récepteurs Ly49.

Dernièrement, quelques groupes ont considéré le récepteur Ly49B dans leurs études. L'étude qu'ont rapportée Kubota et collaborateurs (1999b) et qu'ont complétée Takei et collaborateurs (2001) portait sur la diversité de l'expression des récepteurs Ly49 sur des cellules NK de souris C57BL/6. Ils ont tout d'abord utilisé des amorces spécifiques au récepteur Ly49B pour déterminer par RT-PCR la présence d'ARNm dans 1000 cellules NK spléniques. Ayant obtenu un résultat positif, ils ont analysé l'ARNm de 80 cellules individuelles de la même façon. Malheureusement, l'ARNm Ly49b n'a été détecté dans aucune cellule. Ceci laisse croire que le récepteur Ly49B serait exprimé trop faiblement sur les cellules NK spléniques pour être détecté par un RT-PCR sur une seule cellule ou que le pourcentage de cellules qui expriment le récepteur Ly49B serait très faible. D'autre part, il est possible que la population de cellules analysées au départ n'était pas pure et que l'ARNm détecté provenait d'autres types cellulaires présents dans la rate. Trois autres études ont montré qu'il est possible d'exprimer le récepteur Ly49B par transfection sur des cellules COS-7 ou C1498 (Corral *et al*; 1999, Hanke *et al*; 1999, Smith *et al*; 2000). Étant donné qu'il n'existe pas d'AcMo spécifique du récepteur Ly49B, une étiquette ajoutée à l'ADN codant pour ce récepteur ou le sérum polyclonal 1298 dirigé contre une fraction de la queue cytoplasmique du récepteur Ly49A et qui reconnaît aussi le récepteur Ly49B ont été utilisés afin d'analyser l'expression de cette protéine par les cellules transfectées. Cela signifie donc que cette protéine peut être exprimée à la surface d'une cellule sans aucune protéine accessoire. Cependant, malgré la disponibilité de cellules transfectées aucun ligand n'a pu être identifié bien que plusieurs molécules du CMH de classe I de différents haplotypes aient été testées (Hanke *et al*; 1999). Il est donc possible que le ligand de ce récepteur soit une molécule du CMH de classe I d'un autre haplotype, que le test n'ait pas été assez sensible possiblement à cause d'une expression insuffisante sur la cellule

transfectée ou tout simplement que le ligand ne soit pas une molécule du CMH de classe I ce qui est concevable étant donné l'individualité de ce récepteur.

Finalement, une étude intéressante a été publiée dernièrement par Williams et ses collaborateurs (2000). Cette équipe a étudié les précurseurs des cellules NK, soit les cellules qui n'ont pas encore acquis le marqueur NK1.1, mais qui expriment par contre la chaîne β commune aux récepteurs de l'IL-2 et l'IL-15. D'après leurs analyses par RT-PCR, ces cellules expriment les récepteurs Ly49B, CD94, NKG2A et NKG2C. Les ARNm des récepteurs Ly49B, CD94 et NKG2A sont détectés lorsque seulement 10 cellules sont testées, tandis que 1000 cellules doivent être analysées pour détecter le récepteur NKG2C. Aucun autre récepteur Ly49 n'est présent à ce stade de différenciation de la cellule NK. Cependant, lorsque les cellules NK1.1⁻ IL-2/15R β ⁺ sont mises en culture sur les cellules stromales OP9, il y a induction de l'expression des autres récepteurs Ly49 et du NK1.1, mais 20 colonies de cellules sur 20 expriment toujours le Ly49B. L'expression précoce et persistante du Ly49B dans des cellules NK en développement démontrée dans cette étude est contraire aux résultats obtenus dans les études de RT-PCR sur des cellules NK spléniques isolées de souris adultes, car lors de ces dernières études aucune des 80 cellules matures testées n'exprimait le récepteur Ly49B, mais toutefois plusieurs autres récepteurs étaient exprimés (Kubota *et al*; 1999b, Takei *et al*; 2001). Tel que mentionné précédemment, il est possible que ce test de RT-PCR sur des cellules individuelles ne soit pas assez sensible pour détecter le Ly49B. De plus, il est aussi possible que dans l'étude de Williams et ses collaborateurs (2000), l'expression de ce récepteur soit limitée à des cellules NK plus immatures, mais que ce stade persiste dans les conditions de culture *in vitro* utilisées ce qui expliquerait pourquoi les résultats obtenus dans ces études diffèrent.

En résumé, même si ce récepteur a été cloné il y a 10 ans, peu de chose sont connues à son sujet. Évidemment, comme aucun AcMo ne reconnaît le récepteur Ly49B, les études qui ont pu être faites sur ce récepteur sont limitées. Pour

l'instant seulement le sérum polyclonal 1298 dirigé contre la partie intracellulaire du récepteur Ly49A reconnaît ce récepteur, mais celui-ci reconnaît aussi plusieurs autres récepteurs Ly49 (Smith *et al*; 2000). Ainsi, il ne peut être utilisé que pour certains types d'expérimentation avec des cellules transfectées.

4. Polyréactivité des anticorps anti-Ly49

L'analyse des récepteurs Ly49A, C, D et G2 a nettement progressé suite à la production d'AcMo qui reconnaissent ces récepteurs. Cependant, la principale difficulté dans la production d'AcMo spécifiques pour un seul récepteur Ly49 est la forte homologie qui existe entre les membres de cette famille. Par conséquent, la majorité des AcMo se lient à plus d'un récepteur Ly49 (Tableau 3). Cependant, les AcMo JR9-318, TNTA, 4LO3311, 12A1, 4E4, SED85, HBF-719, 4LO439, 3/25 et YLI-90 ne se lient qu'à un seul récepteur, mais ces spécificités uniques sont à confirmer car elles n'ont pas été défiées par les récepteurs Ly49L à Ly49W qui n'ont été clonés que récemment. Ceci illustre le problème majeur de l'analyse des récepteurs Ly49, car plusieurs études ont été effectuées avec des AcMo multispécifiques sans que cette réactivité croisée ne soit prise en considération. Plusieurs résultats ont donc dû être réinterprétés.

Pour ajouter à la complexité de l'analyse des récepteurs des cellules NK, seulement les récepteurs Ly49A, Ly49C, Ly49D, Ly49G2 et Ly49I ont des AcMo qui leur sont spécifiques. C'est d'ailleurs pour cette raison que ces récepteurs sont les mieux caractérisés. Néanmoins, il est important de noter que le contexte dans lequel les AcMo sont utilisés peut faire en sorte qu'une spécificité multiple soit négligeable. Par exemple, les récepteurs Ly49L, O, P et R à W ne sont pas présent chez la souris C57BL/6, ce qui implique que les AcMo YE1/32, YE1/48, A1 et Cwy-3 sont spécifiques pour un seul récepteur lorsqu'ils sont utilisés sur les cellules de cette souris (Tableaux 2 et 3).

Tableau 3 : Spécificité des AcMo anti- Ly49

	Ly49																					
AcMo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	
YE1/32	1													2		25		25		25		
YE1/48	4										3			2		25		25		25		
A1 ¹	4													5								
JR9-318	6																					
TNTA ²	7																					
SW5E6			1							8												
4LO3311			9																			
5GA5			10							10												
12A8	17			11												25						
12A1				12																		
4E5				12										2		25				25		
4E4				13																		
SED85				14																		
4D12			15		15																	
HBf-719						14																
4D11	17						16				3							25			18	
4LO439 ¹							10															
K2D ³							19															
Cwy-3 ^{1,4}							20														18	
3/25 ¹							7															
IF8			21					21	21										25			
3D10								22	22													
8H7									23	23												
YLI-90									14													
14B11 ⁵			24			24		24	24													

D'après 1-Brennan *et al* (1994), 2- Makrigiannis *et al* (1999), 3- Makrigiannis *et al* (2000), 4- Yokoyama *et al* (1990), 5- Silver *et al* (2000), 6- Roland & Cazenaze (1992), 7- Tanamachi *et al* (2001), 8- Brennan *et al* (1996b), 9- Gosselin *et al* (1997), 10- Dépatie *et al* (1999), 11- Mason *et al* (1996), 12- Ortaldo *et al* (1999), 13- Idris *et al* (1999), 14- Coles *et al* (2000), 15- Van Beneden *et al* (2001), 16- Mason *et al* (1995), 17- Takei *et al* (1997), 18- Silver *et al* (2001), 19- Kubota (1997), 20- Chang *et al* (1999). 21- Daniels *et al* (2001), 22- Smith *et al* (2000), 23- Lai *et al* (1999), 24- Corral *et al* (1999), 25- Makrigiannis *et al* (2001)

Les numéros dans le tableau correspondent à la publication dans laquelle la spécificité de l'AcMo a été mentionnée la première fois. Les numéros en gras indiquent la spécificité principale de l'AcMo

Les récepteurs Ly49K et Ly49N ont été exclus de ce Tableau, car aucune analyse de spécificité des AcMo n'a été faite avec ces récepteurs étant donné qu'ils sont codés par des pseudogènes (McQueen *et al*; 1999).

Note :

- 1- Spécifique pour l'allèle C57BL/6
- 2- Spécifique pour l'allèle BALB/c
- 3- Reconnaît aussi un autre récepteur Ly49 qui n'a pas été identifié
- 4- Spécifique pour l'allèle NOD
- 5- Aucun récepteur Ly49 en particulier n'était ciblé pour la production de cet AcMo

Malgré la disponibilité d'une quantité impressionnante d'AcMo anti-Ly49, aucun ne se lie, pour l'instant, aux récepteurs Ly49B, Ly49M, Ly49Q et Ly49S. Cependant, tel que mentionné précédemment, ces trois derniers récepteurs n'ont pas été analysés avec tous les AcMo disponibles. Toutefois, à l'aide de cellules transfectées, les 25 AcMo anti-Ly49 identifiés dans le Tableau 3 ont été testés contre le récepteur Ly49B, mais aucun ne s'y est lié. Ceci est certainement dû aux particularités présentes dans sa séquence, car tel que mentionné précédemment à la Section 3.5, il est le récepteur qui présente le moins d'homologie avec les autres membres de cette famille.

En résumé, l'homologie de séquence entre tous les récepteurs Ly49 est un obstacle majeur à la production d'AcMo spécifiques pour un seul récepteur. Toutefois, malgré les singularités du récepteur Ly49B, aucun AcMo ne se lie à cette protéine.

5. Raison d'être et objectifs du projet

Le rôle physiologique de plusieurs récepteurs Ly49 sur l'activité des cellules NK est assez bien défini. Toutefois, pour parvenir à dresser un modèle d'action de ces récepteurs, il faut tout d'abord en caractériser le plus possible. Tel que mentionné à la Section 3.5, il y a peu de choses connues à propos du récepteur Ly49B. Étant donné la séquence distincte de ce récepteur, nous croyons que le début de sa caractérisation passe par l'obtention d'un AcMo spécifique. En effet, contrairement aux autres membres de cette famille, la séquence du récepteur Ly49B possède plusieurs groupes d'acides aminés uniques qui seraient parfaits comme épitope pour un AcMo spécifique. De plus, étant donné que notre laboratoire a produit l'AcMo 4LO3311 qui reconnaît uniquement le récepteur Ly49C et qu'il a été démontré que l'épitope de cet AcMo ne diffère que par un seul aa avec la séquence présente chez le récepteur Ly49I avec laquelle il ne réagit pas (Lian *et al*; 1999), nous sommes très confiants de pouvoir sélectionner

un AcMo spécifique du récepteur Ly49B puisque ce récepteur contient dans sa portion extracellulaire plusieurs séquences qui lui sont exclusives.

Un tel réactif est essentiel pour déterminer la distribution et l'expression du récepteur Ly49B. Pour atteindre ce but, plusieurs types cellulaires de différentes souches de souris seront analysés afin de déterminer le niveau d'expression du récepteur, sa modulation selon l'haplotype H-2 de la souris et sa coexpression avec les autres récepteurs Ly49.

De plus, un AcMo anti-Ly49B permettra de confirmer la capacité inhibitrice de ce récepteur pour lequel les conséquences de l'engagement n'ont pu être déterminées, son ou ses ligand(s) n'ayant pas été identifié(s).

C. Méthodologie

Remarque : Pour alléger le texte, la composition des milieux et solutions utilisés est décrite à l'Annexe 1. De plus, sauf indication contraire, le milieu de culture et le sérum de veau fœtal (SVF) ont été achetés de Gibco BRL (Burlington, ON, Canada) et les enzymes de Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, Qc, Canada). Enfin, toutes les enzymes ont été utilisées selon les recommandations du fournisseur.

1. Enrichissement de cellules NK et production de cellules LAK

1.1 Isolement de splénocytes

La rate de souris CBA/J femelles (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) âgées d'au moins 7 semaines a été prélevée stérilement et déposée dans un volume minimal de RPMI 1640 complet (RPMIc). La rate a été triturée délicatement et la suspension de cellules a ensuite été filtrée à travers une pipette pasteur qui contenait un coussinet de laine de nylon afin d'éliminer les fragments de tissus non triturés. Les érythrocytes ont été lysés par un choc osmotique avec de l'eau distillée stérile et les splénocytes ont été récupérés par centrifugation après correction de l'osmolarité avec du milieu RPMIc.

1.2 Sélection négative des cellules NK

Les lymphocytes B et les macrophages ont été éliminés de la suspension de splénocytes par passage sur une colonne de laine de nylon. La colonne a été mise à 37°C pendant 45 min pour permettre l'attachement des cellules. Puis, les cellules non-adhérentes ont été récupérées en éluant la colonne avec du RPMIc à 37°C. Cette opération a été répétée une deuxième fois. Ensuite, afin d'éliminer les lymphocytes T et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), le filtrat de cellules non-adhérentes a été incubé 20 min sur glace avec l'AcMo de rat MT4 (anti-CD4), suivi de 30 min avec les AcMo de rat 53-6.72 (anti-CD8) et M1/69 (anti-CD24). Après deux lavages des cellules, des billes magnétiques (Dyna)

Great Neck, NY, USA) ont été ajoutées à la suspension cellulaire à raison de 5 billes pour 1 cellule et le mélange a été incubé 30 min sur glace. Ces billes étant couplées à des Ig de mouton anti-Ig de rat, elles se lieront aux cellules T et PMN qui auront réagi avec les anticorps. Finalement, les complexes billes-cellules sont récupérés à l'aide d'un aimant et les cellules CD4⁺CD8⁺CD24⁻ peuvent être recueillies dans le milieu. Cette procédure permet d'obtenir environ 2×10^6 cellules par rate dont la majorité sont des cellules NK.

1.3 Production de cellules LAK

Les cellules NK enrichies sont mises en culture à environ 1×10^6 cellules/ml dans du RPMIc additionné de 20% de SVF, 50 μ M de 2-mercaptoéthanol (Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) et 500 U/ml d'IL-2 recombinante de souris (Roche, Laval, Qc, Canada). Les cellules LAK peuvent être gardées en culture pendant un maximum de 14 jours à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ en maintenant leur concentration à 1×10^6 cellules/ml par l'ajout quotidien du même milieu de culture.

2. Production du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B

2.1 Clonage à l'intérieur du vecteur d'expression pPICZ α A

Le domaine extracellulaire du récepteur Ly49B (acide aminés 68 à 288) a été cloné à l'intérieur du vecteur d'expression de *Pichia pastoris* pPICZ α A (Annexe 2) qui contient le gène de résistance à la zéocine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ainsi, la protéine tronquée est sous le contrôle du promoteur inductible de l'alcool oxydase et dans le même cadre de lecture que le peptide signal du facteur α de *Saccharomyces cerevisiae* et des étiquettes c-myc et 6xHis. L'ADNc du domaine extracellulaire du Ly49b a été amplifié par PCR à partir du vecteur pBCMGS-Ly49B obtenu du Dr Fumio Takei (Université de Colombie-Britannique, Vancouver, CB, Canada) avec les amorces 49bKpnI et 49bXbaI (Tableau 4). Les

Tableau 4 : Listes des amorces utilisées pour les amplifications par PCR et le séquençage

amorces	séquences
49bKpnI	5'ACC <u>GGT ACC</u> ATT TTC CGG GAT GGA CAA GAG 3'
49bKbaI	5' <u>GAT CTA GAC</u> TTT CAT CTT CAT CCC TCT GC 3'
5'AOX1	5'GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC 3'
3'AOX1	5'GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC 3'
facteur α	5'TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC 3'
49bBamF	5'TAG <u>GAT CCA</u> TGA GTG AGC AGG AGG TCA CT 3'
49bBamR	5' <u>GTG GAT CCT</u> TAA CTT TCA TCT TCA TCC CT 3'
5'SR α	5'CCC TGC TTG CTC AAC TCT AGC TC 3'
3'SR α	5'CAC TGC ATT CTA GTT GTG GTT TG 3'
fUSE5 LP	5'TGA ATT TTC TGT ATG AGG 3'

Les nucléotides soulignés représentent les sites de clivage des enzymes de restriction utilisées pour chaque clonage.

sites de restriction des enzymes *KpnI* et *XbaI* ont été ajoutés pour permettre le clonage directionnel à l'intérieur du vecteur (nucléotides soulignés). Le PCR a été effectué dans les conditions suivantes : 1 cycle de 3 min à 95°C suivi de 30 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 50°C et 1 min à 72°C pour finir avec 1 cycle de 7 min à 72°C.

Après la visualisation du produit de PCR par migration sur gel d'agarose 0,7%, le fragment a été purifié à l'aide de la trousse « GFX™ PCR DNA and gel band purification kit » (Amersham Pharmacia Biotech). Puis, le fragment de PCR et le vecteur pPICZαA ont été clivés par les enzymes *KpnI* et *XbaI* pendant 3 h à 37°C. Le vecteur et l'ADNc du Ly49b ont été joints avec de la ligase T4 en présence d'ATP à la température de la pièce pendant 18 h. Par la suite, les bactéries compétentes TOP10F' (Tableau 5) (Invitrogen) ont été transformées par un choc thermique à 42°C. En bref, une fraction du produit de la réaction de ligation a été ajoutée aux bactéries compétentes dans un tube Falcon de 10 ml (Fisher Scientific) et le mélange a été incubé 40 min sur glace. Ensuite, le mélange a été mis à 42°C pour 2 min puis 1 ml de milieu LB faible en sel (LBfs) a été ajouté pour permettre l'expression phénotypique du gène de résistance à la zéocine. Cette expression phénotypique a eu lieu sous agitation à 37°C pendant 30 à 45 min. Pour obtenir les transformants, 100 µl de la réaction de transformation ont été mis sur une gélose LBfs qui contenait 25 µg/ml de zéocine. L'ADN de 24 transformants a été purifié selon la technique de la trousse « Flexi prep » (Amersham Pharmacia Biotech), mais avec des solutions I, II et III préparées dans notre laboratoire. Les vecteurs purifiés ont ensuite été analysés pour la présence de l'ADNc du Ly49b par digestion exhaustive avec les enzymes *KpnI* et *XbaI*. Puis, l'ADN de certains clones positifs a été produit en grande quantité pour la transformation de levures *Pichia pastoris*. L'intégrité de l'ADN de ces transformants a été vérifiée par séquençage avec les amorces 5'AOX1, facteur α et 3'AOX1 (Tableau 4) par le service de séquençage du Dr François Denis (INRS-Institut Armand Frappier, Laval, Qc, Canada) avec un système d'analyse d'ADN CEQ 2000XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Tableau 5 : Caractéristiques des souches d'*Escherichia coli* et de *Pichia pastoris*

<i>E. coli</i>	Génotypes	
TOP10F'	F' { <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> ΔM15, Tn10(Tet ^R)} <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ80/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , λ ⁻ <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	
DH11S	<i>mcrA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>) Δ(<i>lac</i> ⁻ <i>proAB</i>) Δ <i>recA1398</i>) <i>deoR</i> <i>rpsL</i> <i>srf</i> <i>thi</i> ⁻ /F' <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q ZΔM15	
MC1061	F' <i>araD139</i> , Δ(<i>ara, leu</i>)7696, Δ(<i>lac</i>) _{x74} , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB1</i>	
K91	Hfr-cavalli, <i>thi</i> -1, Kan ^R	
<i>P. pastoris</i>	Génotypes	Phénotypes
X-33	type sauvage	Mut ⁺
KM71H	<i>Arg4 aox1::ARG4</i>	Mut ^s , Arg ⁺
GS115/Albumine	<i>HIS4</i>	Mut ^s
GS115/pPICZ/ <i>lacZ</i>	<i>his4</i>	His ⁻ , Mut ⁺

Le vecteur pPICZ α A-Ly49b a été nommé pZ α 49b et sera désigné ainsi pour la suite de ce mémoire.

2.2 Préparation et transformation de levures compétentes

La préparation et la transformation des levures compétentes X-33 et KM71H (Tableau 5) ont été faites en parallèle selon les instructions du manuel inclus dans la trousse « EasySelect™ *Pichia* Expression kit » de Invitrogen. En bref, 250 ml de milieu YPD (dans un erlenmeyer de 1 L) ont étéensemencés avec 50-250 μ l d'une culture de levure de 18 h de 5 ml faite à partir d'une colonie isolée. Ensuite, la culture a été incubée à 30°C environ 18 h soit jusqu'à ce que la densité optique (DO) à 600 nm atteigne 1,3-1,5. Les cellules ont été récoltées par une centrifugation de 5 min à 1500 x *g* à 4°C et lavées successivement avec 250 ml et 125 ml d'eau stérile à 0°C, puis avec 20 ml de sorbitol 1 M stérile à 0°C. Finalement, les cellules ont été reprises dans 0,5 ml de sorbitol 1 M.

Pour la transformation, 5 à 10 μ g d'ADN pZ α 49b linéarisé avec l'enzyme ScaI ont été ajoutés à 80 μ l de levures compétentes. Le mélange a été transféré dans une cuvette à électroporation de 0,2 cm, puis incubé sur glace pendant 5 min avant de procéder à l'électroporation (BioRad Gene Pulser™, 1,5 kV, 25 μ F, 200 Ω , BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Immédiatement après l'électroporation, 1 ml de sorbitol 1 M à 0°C a été ajouté aux cellules. Ensuite, les cellules ont été mises à 30°C (sans agitation), 1 à 2 h avant d'ensemencer un pétri YPDS additionné de 50 ou 100 μ g/ml de zéocine avec 50, 100 ou 200 μ l de la suspension. Finalement, il a fallu attendre de 4 à 10 jours pour voir apparaître les transformants. Les témoins négatif et positif de transformation étaient, respectivement, des levures transformées avec de l'eau stérile et le vecteur pPICZ α A linéaire.

2.3 Criblage des transformants résistants à la zéocine

Les protéines sécrétées par les transformants résistants à la zéocine ont été analysées pour voir si ces derniers expriment une protéine de 30 kDa en conditions réductrices ou de 60 kDa en conditions non-réductrices (taille estimée de la protéine de fusion Ly49Bextra-myc-his avec le logiciel « Clone Manager »). Chaque transformant a été utilisé pour inoculer 10 ml de milieu BMGY qui a été incubé à 30°C toute la nuit sous agitation pour obtenir une biomasse assez concentrée. Les cellules ont été récoltées par une centrifugation de 5 min à 1500 x g et les culots ont été repris dans 1 ml de milieu BMMY qui contient du méthanol à une concentration de 0,5% ce qui permet l'induction du promoteur. L'induction a eu lieu à 30°C pendant 4 jours sous agitation. À toutes les 24 h, du méthanol a été ajouté aux cultures à une concentration finale de 0,5% pour poursuivre l'induction. De plus, des échantillons ont été prélevés toutes les 24 h pour pouvoir suivre la cinétique d'induction des protéines. Les conditions d'induction ont été vérifiées avec la souche témoin GS115/Albumine (Tableau 5) qui sécrète de l'albumine à plus de 1 g/L. Il est à noter qu'une aération importante est nécessaire pour l'induction de la production de protéines. À cet effet, ces réactions ont été faites dans des tubes coniques de 50 ml dont le bouchon n'était que partiellement vissé et fixé avec du ruban adhésif.

Le surnageant de chaque prélèvement a été gardé pour l'analyse de la production de protéine par SDS-PAGE. Pour ce faire, 10 µl de surnageant ont été chargés sur un gel de polyacrylamide (10 ou 12%) dans une dilution 1/2 avec un tampon de chargement réducteur ou non. Les protéines sécrétées par chacun des transformants ont été visualisées par coloration au bleu de Coomassie (0,1%, 30 min) ou par un immunobuvardage de type western sur une membrane de nylon avec un AcMo de souris anti-6xHis (Amersham Pharmacia Biotech).

3. Production de cellules transfectées avec le récepteur Ly49B

3.1 Clonage à l'intérieur du vecteur d'expression SR α puro

La séquence codante du récepteur Ly49B a été clonée dans le vecteur SR α puro (Annexe 3) gracieusement fourni par Dr Pascale Duplay de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Takebe *et al*, 1988). Ce vecteur contient les gènes de résistance à l'ampicilline et à la puromycine. Le site de clonage multiple est en amont du promoteur hybride SR α et en aval d'un signal de polyadénylation. La séquence complète du récepteur Ly49B a été amplifiée par PCR à partir du vecteur pBCMGS-Ly49B à l'aide des amorces 49bBamF et 49bBamR (Tableau 4) avec les mêmes paramètres de PCR qu'à la Section 2.1. La séquence de l'enzyme de restriction *Bam*HI a été ajoutée aux amorces pour permettre le clonage (nucléotides soulignés). Avant la ligation du fragment de PCR et du vecteur SR α puro clivé par *Bam*HI, les extrémités du vecteur ont été déphosphorylées à l'aide de la phosphatase alcaline pour réduire le risque de ligation du vecteur sur lui-même. Ensuite, la ligation du vecteur et de l'ADNc du Ly49b a été effectuée en les incubant avec la ligase T4 en présence d'ATP toute une nuit à la température de la pièce. Après la ligation, des bactéries DH11S (Tableau 5) ont été transformées par un choc thermique (décrit à la Section 2.1). Cette fois-ci, le milieu 2XTY a été utilisé et 100 μ g/ml d'ampicilline ont été ajoutés aux géloses pour la sélection de transformants. L'ADN des transformants résistants à l'ampicilline a été analysé par digestion exhaustive. La séquence d'un clone a été vérifiée par séquençage avec les amorces 5'SR α et 3'SR α (Tableau 4) par le service de séquençage du Dr François Denis. Le clone séquencé a été produit et purifié en grande quantité. Ce vecteur sera dorénavant désigné SR α 49b.

3.2 Transfection de cellules Jurkat J77.6

Vingt μg d'ADN SR α 49b purifié selon le protocole décrit à la Section 3.1 ont été utilisés pour transfecter 1×10^7 cellules T lymphomateuses Jurkat J77.6 (données par le Dr Pascale Duplay). L'électroporation a eu lieu dans une cuvette de 0,4 cm avec un électroporateur BioRad Gene PulserTM (0,25 kV, 960 μF). Puis, rapidement, le contenu de la cuvette a été transféré dans un flacon de culture de 75 cm² qui contenait 20 ml de RPMIc additionné de 10% de SVF. Les cellules ont été mises à 37°C, dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pour 48 h. Afin de faire un clonage en milieu sélectif, deux plateaux de 96 puits à une concentration de 5×10^4 cellules/puits, deux plateaux à 10×10^4 cellules/puits et un plateau à 20×10^4 cellules/puits ont été préparés dans un milieu RPMIc additionné de 10% SVF et de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromycine. Les plateaux ont été mis à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ jusqu'à l'apparition des transfectants (environ 2 semaines).

3.3 Criblage des transfectants résistants à la puromycine

Lorsqu'un puits d'une plaque de transfection contenant un seul clone a atteint 20 à 25% de confluence, les cellules ont été transférées dans un puits d'une plaque de 24 puits. Une fois que ce puits a atteint la confluence, la moitié des cellules ont été prélevées et lavées deux fois avec de l'eau physiologique tamponnée à pH 7,4 (PBS). Les cellules ont été lysées en les bouillant dans du tampon de chargement de gel SDS-PAGE non-dénaturant 5 min. Ensuite, une fraction du lysat cellulaire a été appliqué sur un gel de polyacrylamide 10% et une analyse par immunobuvardage de type western a été faite avec un mélange 1:1 de deux anticorps polyclonaux dirigés contre les parties intracellulaires des récepteurs Ly49A et Ly49C (gracieuseté du Dr Pascale Duplay). Étant donné l'homologie de séquences des récepteurs Ly49 dans la queue cytoplasmique, il est possible qu'un des ces anticorps reconnaisse aussi le récepteur Ly49B.

4. Immunisations

4.1 Avec des cellules LAK de souris CBA/J

Des rats F-344 (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) et DA (Harlan, Indianapolis, IN, USA) femelles ont été immunisés à partir de 9 semaines selon le protocole décrit dans le Tableau 6 (A1 à A9). Il est à noter qu'avant chaque immunisation les cellules ont été lavées 3 à 5 fois avec du PBS. Au maximum, 0,6 ml a été injecté par la voie sous-cutanée et 1,0 ml par la voie intrapéritonéale. Une saignée à l'œil a été faite 10 à 12 jours après chaque immunisation pour pouvoir analyser la réaction immunitaire des animaux.

4.2 Avec des cellules transfectées

Des rats F-344 femelles de 6 et 15 semaines ont été immunisés avec des cellules Jurkat J77.6 transfectées avec l'ADNc du Ly49b (JB29) selon le protocole d'immunisation du Tableau 6 (A10 à A14). De 11 à 30 x 10⁶ cellules (lavées 3 à 5 fois avec du PBS) ont été injectées par immunisation dans un maximum de 1 ml. Une saignée à l'œil a été faite 10 à 12 jours après chaque immunisation pour suivre la réponse immunitaire des animaux.

5. Fusions

La technique de fusion a été grandement inspirée par le protocole publié dans « Current Protocol in Immunology » (CPI) (Section 2.5, 1991). Trois jours après la dernière immunisation, le rat choisi a été saigné à l'œil puis sacrifié selon les recommandations du conseil canadien de protection des animaux de laboratoire (CCPAL) afin de pouvoir prélever la rate (le tout dans des conditions stériles). Après avoir lavé la rate deux fois avec du DMEMc, la rate a été triturée délicatement. La suspension de cellules spléniques a alors été filtrée sur coussinet de laine de nylon pour éliminer les agrégats. Les cellules ont été

Tableau 6: Protocole d'immunisation des rats

(sc): voie sous-cutanée, (ip): voie intrapéritonéale

Arrivée (6 sem)	A1 (F-344)	A2 (F-344)	A3 (F-344)	A4 (F-344)	A5 (F-344)	A6 (F-344)	A7 (DA)
Arrivée (6 sem)	23-7-99	23-7-99	23-7-99	26-1-00	26-1-00	26-1-00	26-1-00
immunogène	LAK	LAK	LAK	LAK	LAK	LAK	LAK
1^{ère} imm.	19-8-99	19-8-99	19-8-99	22-2-00	22-2-00	22-2-00	22-2-00
	sc 5 x 10 ⁶	sc 5 x 10 ⁶	sc 5 x 10 ⁶	sc 9 x 10 ⁶	sc 9 x 10 ⁶	sc 9 x 10 ⁶	sc 9 x 10 ⁶
2^e imm.	5-10-99	5-10-99	5-10-99	14-3-00	14-3-00	14-3-00	14-3-00
	sc 5 x 10 ⁶	sc 5 x 10 ⁶	sc 5 x 10 ⁶	sc 10 x 10 ⁶	ip 15 x 10 ⁶	ip 7 x 10 ⁶	ip 7 x 10 ⁶
3^e imm.	15-11-99	15-11-99	15-11-99	10-4-00	10-4-00	10-4-00	10-4-00
	sc 7 x 10 ⁶	sc 7 x 10 ⁶	sc 7 x 10 ⁶	ip 10 x 10 ⁶	ip 10 x 10 ⁶	ip 10 x 10 ⁶	ip 10 x 10 ⁶
4^e imm.	20-1-00					19-6-00	
	sc 6 x 10 ⁶					ip 20 x 10 ⁶	
fusion	23-1-00	18-11-99				22-6-00	

Arrivée (6 sem)	A8 (DA)	A9 (DA)	A10 (F-344)	A11 (F-344)	A12 (F-344)	A13 (F-344)	A14 (F-344)
Arrivée (6 sem)	26-1-00	26-1-00	18-12-00	18-12-00	8-5-01	8-5-01	3-7-01
immunogène	LAK	LAK	JB29	JB29	JB29	JB29	JB29
1^{ère} imm.	22-2-00	22-2-00	26-2-01	26-2-01	10-5-01	10-5-01	5-7-01
	sc 9 x 10 ⁶	sc 9 x 10 ⁶	ip 15 x 10 ⁶	ip 11 x 10 ⁶	ip 15 x 10 ⁶	ip 15 x 10 ⁶	ip 30 x 10 ⁶
2^e imm.	14-3-00	14-3-00	27-3-01	19-3-01	24-5-01	31-5-01	20-7-01
	sc 10 x 10 ⁶	ip 15 x 10 ⁶	ip 20 x 10 ⁶	ip 18 x 10 ⁶	ip 20 x 10 ⁶	ip 20 x 10 ⁶	ip 30 x 10 ⁶
3^e imm.	10-4-00	10-4-00		24-4-01	8-6-01	22-6-01	
	ip 10 x 10 ⁶	ip 15 x 10 ⁶		ip 20 x 10 ⁶	ip 23 x 10 ⁶	ip 22 x 10 ⁶	
fusion	13-4-00	30-3-01	27-4-01	11-6-01	25-6-01	23-7-01	

récupérées par centrifugation (5 min, 500 x g, 4°C) et lavées trois fois avec du DMEMc. Simultanément, des cellules myélomateuses P3X63Ag8.653 obtenues soit du Dr Serge Dea soit du Dr Pierre Talbot (INRS-Institut Armand-Frappier) ou des cellules SP2/0-Ag14 obtenues du Dr Serge Dea ont été prélevées en phase exponentielle et lavées trois fois. Chaque culot a été repris dans 10 ml de DMEMc et un compte cellulaire a été fait. Les cellules ont alors été mélangées ensemble selon un ratio de 1 cellule myélomateuse pour 10 cellules spléniques. Ainsi, $2,5 \times 10^7$ cellules myélomateuses et $2,5 \times 10^8$ cellules spléniques ont été nécessaires pour ensemer 10 plateaux de 96 puits à une concentration de $2,5 \times 10^5$ cellules/puits.

Après avoir mis ensemble le nombre requis de chaque type cellulaire, la suspension a été centrifugée et le culot a été fragilisé délicatement. Les prochaines étapes ont été faites dans un bécher contenant de l'eau à 37°C et chaque solution ou milieu était aussi à 37°C. Un ml de PEG 3000 50% (Sigma Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) a d'abord été ajouté goutte-à-goutte en agitant délicatement avec la pipette pendant une minute. Ensuite, la solution a été agitée pour une autre minute avec la pipette. Puis, 1 ml de DMEMc a été ajouté aux cellules de la même façon que le PEG pendant 1 min. Cette étape a été répétée une fois sans agiter entre les opérations. Finalement, 7 ml de DMEMc ont été ajoutés aux cellules en brassant avec la pipette durant 2 à 3 min.

Les cellules ont été récoltées par centrifugation et le culot a été repris dans du DMEMc-H-P additionné de 20% SVF en ajoutant 10 ml à la fois autant de fois que nécessaire pour atteindre le volume désiré. Finalement, des échantillons d'environ 100 µl (2 gouttes) de la suspension de cellules ont été distribués dans des plaques de 96 puits à fond plat à l'aide d'une pipette de 5 ml. Les plateaux ont été mis à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Après 24 h, 100 µl de milieu de sélection DMEMc-H-P-HAT additionné de 20% de SVF ont été ajoutés. Le milieu de tous les puits a été changé aux jours 2, 3, 4, 5, 7, 9 et 11 avec le même milieu de culture pour éliminer les produits toxiques de

dégradation des cellules mortes. Au jour 13 (ou avant s'il y avait des puits assez confluents pour le criblage), le milieu a été changé avec du DMEMc-H-P-HT additionné de 20% de SVF. Un ou deux jour(s) après l'addition du milieu HT le milieu a été changé avec du DMEMc-H-P additionné de 20 % SVF. Finalement, tout au long de l'étape de criblage, le milieu des puits a été changé à tous les 2 ou 3 jours avec de DMEMc-H-P additionné de 20% de SVF.

6. Production de la banque de phages recombinants

6.1 Identification des séquences cibles

Après avoir examiné la séquence du récepteur Ly49B, 7 séquences cibles de 8 acides aminés ont été identifiées (Figure 3, soulignées en rouge). Ces séquences sont riches en acides aminés uniques au récepteur Ly49B. De plus, ces séquences ne se retrouvent pas chez les récepteurs Ly49 présents chez le rat. Afin de sélectionner les séquences qui soient potentiellement les plus pertinentes, nous les avons choisies en tenant compte de la présence d'acides aminés reconnus pour être importants dans les liaisons anticorps/antigène selon l'étude faite sur la liaison entre l'hormone de croissance humaine et 21 anticorps monoclonaux qui se lient à cette protéine (Jin *et al*; 1992). Finalement, les séquences envoyées au service de séquençage tenaient compte des codons utilisés lors de la synthèse des protéines chez les bactéries *Escherichia coli* (Sharp *et al*; 1988).

6.2 Préparation des inserts

Les séquences sélectionnées ont été insérées dans la protéine pIII du phage filamenteux fUSE5 selon la technique publiée par Scott et Smith (1990). À cet effet, des oligonucléotides correspondant aux séquences choisies ont été synthétisés par le service de synthèse d'oligonucléotides du Dr François Shareck (INRS-Institut Armand-Frappier). Des fragments du site de clivage de l'enzyme de restriction *SfiI* ont été ajoutés à chaque extrémité des oligonucléotides pour

permettre la ligation de ceux-ci avec le vecteur (nucléotide en gras dans le Tableau 7). Il est à noter que deux séquences complémentaires ont été synthétisées pour chaque séquence choisie afin d'avoir un insert double brin (Tableau 7).

Les oligonucléotides ont été purifiés et concentrés par une précipitation à l'éthanol. Ensuite, les oligonucléotides ont été phosphorylés à l'aide de la kinase T4 en présence d'ATP pendant une heure à 37°C. Certains oligonucléotides ont aussi été phosphorylés directement lors de leur synthèse. Les oligonucléotides complémentaires ont ensuite été appariés afin d'obtenir un insert double brin avec des extrémités cohésives comme si celui-ci avait été clivé par l'enzyme *SfiI*. Pour l'assemblage, un ratio 1:1 d'oligonucléotides a été chauffé à 90°C pendant 5 min pour nous assurer que l'ADN était bien dénaturé et l'appariement s'est effectué lors de la descente de la température du bloc chauffant jusqu'à la température de la pièce (environ 4 h).

6.3 Préparation du vecteur

Le vecteur qui code pour la bagage génétique du phage fUSE5 a été obtenu du Dr Rosemonde Mandeville (Biophage, Ville St-Laurent, Qc, Canada) avec la permission du Dr George Smith (Université du Missouri, Columbia, MO, USA). Ce vecteur contient un gène de résistance à la tétracycline et deux sites de restriction pour l'enzyme *SfiI* à l'intérieur de la séquence de la protéine pIII. Ce vecteur a été purifié sur gradient de chlorure de césium ou avec la trousse de purification d'ADN « QIAGEN® Plasmid Maxi Kits » (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). Par la suite, le vecteur a été clivé avec l'enzyme *SfiI* (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Qc, Canada) et purifié par 2 extractions successives au phénol/chloroforme, suivi d'une précipitation à l'éthanol.

Tableau 7: Séquences des amorces insérées dans le phage fUSE5

Phages Région du Ly49B		Amorces	
BT	aa 84 à 91 NLRQYQV	5' 3'	GGGCTAACCTCCGTCAAGAGTACCAAGTTGGGGCCGGCTG3' TGGCCCCGATTGGAGGCAGTTCTCATGGTCCAACCCCGGC
BT2	aa 93 à 100 KNDSSLME	5' 3'	GGGCTAAAAACGACAGCTCCCTGATGGAAGGGGGCCGGCTG3' TGCCCCGATTTTGTGCTGTCGAGGGACTACCTTCCCCCGGC
BC	aa 193 à 200 KSQLQRNT	5' 3'	GGGCTAAATCCCAACTTCAACGTAAACACAAGGGGGCCGGCTG3' TGCCCCGATTTAGGGTTGAAGTTGCAATTGTGTCCCCCGGC
BC2	aa 230 à 237 NSVNRQK	5' 3'	GGGCTAACTCTGTACCTAACCCGTCAAAAGGGGGCCGGCTG3' TGCCCCGATTGAGACATGGATTGGCAGTTTCCCCCGGC
BC3	aa 276 à 283 RTQSALQR	5' 3'	GGGCTCGTACTCAATCTGCTCTGCAGCGTGGGGCCGGCTG3' TGCCCCCGAGCATGAGTTAGACGAGACGTGCAACCCCGGC
BC4	aa 212 à 219 EESQQIGD	5' 3'	GGGCTGGCTCCCAAGCCCTGCTCTCCAAGGGGGCCGGCTG3' TGCCCCCGACCGAGGGTGCCGGACGAGAGGTTTCCCCCGGC
BC5	aa 243 à 250 SFSTEEDD	5' 3'	GGGCTTCTTTTCTACAGAAGAGGATGACGGGGCCGGCTG3' TGCCCCCGAAGAAAAGATGTCTTCTCCTACTGCCCCCGGC

Note: Les acides aminés en gras correspondent aux fragments d'un site de restriction Sfil

6.4 Production des vecteurs recombinants

La liaison de chaque insert double brin au vecteur fUSE5 (clivé) a été effectuée à l'aide de la ligase T4 en présence d'ATP pendant une nuit à la température de la pièce. Une fraction du produit de la réaction de ligation a été utilisée pour transformer les bactéries MC1061 électrocompétentes (BioRad Laboratories) (Tableau 5). L'ADN a été ajouté à 60 µl de bactéries congelées. Après que les bactéries aient été décongelées, elles sont restées 30 sec sur glace avant d'être transférées dans une cuvette à électroporation de 0,1 cm. L'électroporation a eu lieu à 1,8 kV, 25 µF et 200 Ω. Immédiatement après l'électroporation, 2 ml de milieu SOC ont été ajoutés aux bactéries. Les bactéries ont été incubées à 37°C pour 1 h sous agitation pour permettre l'expression phénotypique. Cent µl du mélange de bactéries ont ensuite été utilisés pour ensemercer des pétris LB contenant 100 µg/ml de streptomycine et 40 µg/ml de tétracycline.

6.5 Test d'infectiosité des phages recombinants

Seuls les vecteurs qui ont un insert dans la séquence de la protéine pIII sont infectieux. Ainsi, un test d'infectiosité est requis pour choisir les bactéries transformées qui produisent des phages recombinants. Le test consiste à mettre en contact les phages et les bactéries K91 sevrées de nutriments. Subséquemment, les phages infectieux vont pouvoir infecter les bactéries. L'activité infectieuse du phage est visualisée par l'apparition de K91 résistantes à la tétracycline. Les bactéries K91 (Tableau 5) (obtenues du Dr Rosemonde Mandeville) ont été cultivées sous agitation à 37°C dans 20 ml de milieu LB jusqu'à ce que la suspension atteigne une DO d'environ 0,45 à 600 nm. Après que les bactéries ont été récoltées par une centrifugation de 10 min à 800 x g à 4°C, elles ont été affamées en les mettant à 37°C dans 20 ml de NaCl 80 mM pendant 45 min sous agitation lente. Elles ont ensuite été récupérées par centrifugation et reprises dans 1 ml de tampon NAP froid.

Pour vérifier la capacité infectieuse des phages, une demi-colonie de MC1061 transformée a été mise dans 10 µl de milieu LB et 10 µl de K91 ont été ajoutés. Le mélange de bactéries a été incubé à la température de la pièce pour 20 min. Puis, 1 ml de milieu LB contenant 0,2 µg/ml de tétracycline a été ajouté. La culture a été mise à 37°C sous agitation pour 30 min. Finalement, des pétris contenant du milieu LB additionné de 100 µg/ml de kanamycine et de 40 µg/ml de tétracycline ont été ensemencés avec 100 µl de la culture non diluée, diluée 100 fois ou 10 000 fois. L'obtention d'au moins 100 colonies dans la dilution 1/100 est une bonne indication de l'infectiosité du phage.

6.6 Analyse des phages par séquençage

L'ADN simple brin des phages recombinants infectieux a été analysé par séquençage pour nous assurer de l'intégrité de chaque insert. Une demi-colonie de MC1061 transformée a servi à ensemencer 1,5 ml de milieu LB additionné de 20 µg/ml de tétracycline. La culture a été incubée 18 h à 37°C sous agitation. Les bactéries ont ensuite été éliminées par centrifugation (10 min, 15 000 x g). Le surnageant (1 ml) qui contient les phages produits par les bactéries infectées a été transféré dans un tube propre et précipité par le PEG/NaCl. Après 1 h à 4°C, les phages ont été récupérés par une centrifugation de 10 min à 15 000 x g. Par la suite, tout le surnageant a été enlevé et une fois le culot séché, il a été repris dans 100 µl de TE. L'ADN simple brin a ensuite été purifié et concentré par une extraction au phénol et au chloroforme et une précipitation à l'éthanol. Finalement, l'ADN a été récupéré par une centrifugation de 10 min à 15 000 x g. Une fois le culot séché, il a été repris dans 20 µl d'eau distillée.

L'ADN a ensuite été envoyé au service de séquençage du Dr Peter Tijssen (INRS-Institut Armand-Frappier). L'amorce fUSE5 LP (Tableau 4) a été utilisée pour le séquençage à l'aide de l'appareil ABI310 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

6.7 Amplification et purification des phages

Une fois la séquence de l'insert confirmée, une colonie de K91 transformée a été prise pour ensemer 1 ml de milieu LB additionné de 20 µg/ml de tétracycline. Après environ 6 h sous agitation à 37°C, la culture a été utilisée pour ensemer 500 ml de milieu LB additionné de 20 µg/ml de tétracycline et de 50 µg/ml de kanamycine. Après une nuit sous agitation à 37°C, les virions présents dans le surnageant de culture ont été récupérés par deux centrifugations successives de 10 min à 4°C à 4500 x g et à 17 500 x g. Les phages ont ensuite été précipités en ajoutant du PEG/NaCl et en incubant le mélange à 4°C pendant 18 h. Puis, les phages ont été récoltés par une centrifugation de 40 min à 11 000 x g à 4°C et ils ont été repris dans 5 ml de tampon tris (TBS). La solution a été incubée 30 min à la température de la pièce avec une agitation au vortex fréquente pour séparer les phages. Ensuite, les virions ont été à nouveau précipités avec du PEG/NaCl pour une nuit à 4°C. Après avoir récupéré les phages par une centrifugation à 7000 x g pendant 40 min à 4°C, ils ont été repris dans 2,5 ml de NaCl 0,15 M. Ensuite, la pureté a été améliorée en ajoutant 277 µl d'acide acétique 1 M et en incubant la suspension successivement 10 min à la température de la pièce et 20 min sur glace. Finalement, les phages ont été récoltés par une centrifugation à 15 000 x g pendant 30 min à 4°C et le culot a été repris dans 1 ml de TBS qui contenait 0,02% d'azoture de sodium. La concentration des phages a été calculée à l'aide de la DO du mélange aux longueurs d'onde 269 nm et 320 nm et de la formule suivante :

$$\frac{(DO_{269} - DO_{320})(6 \times 10^{16})}{9200} = \text{virions/ml}$$

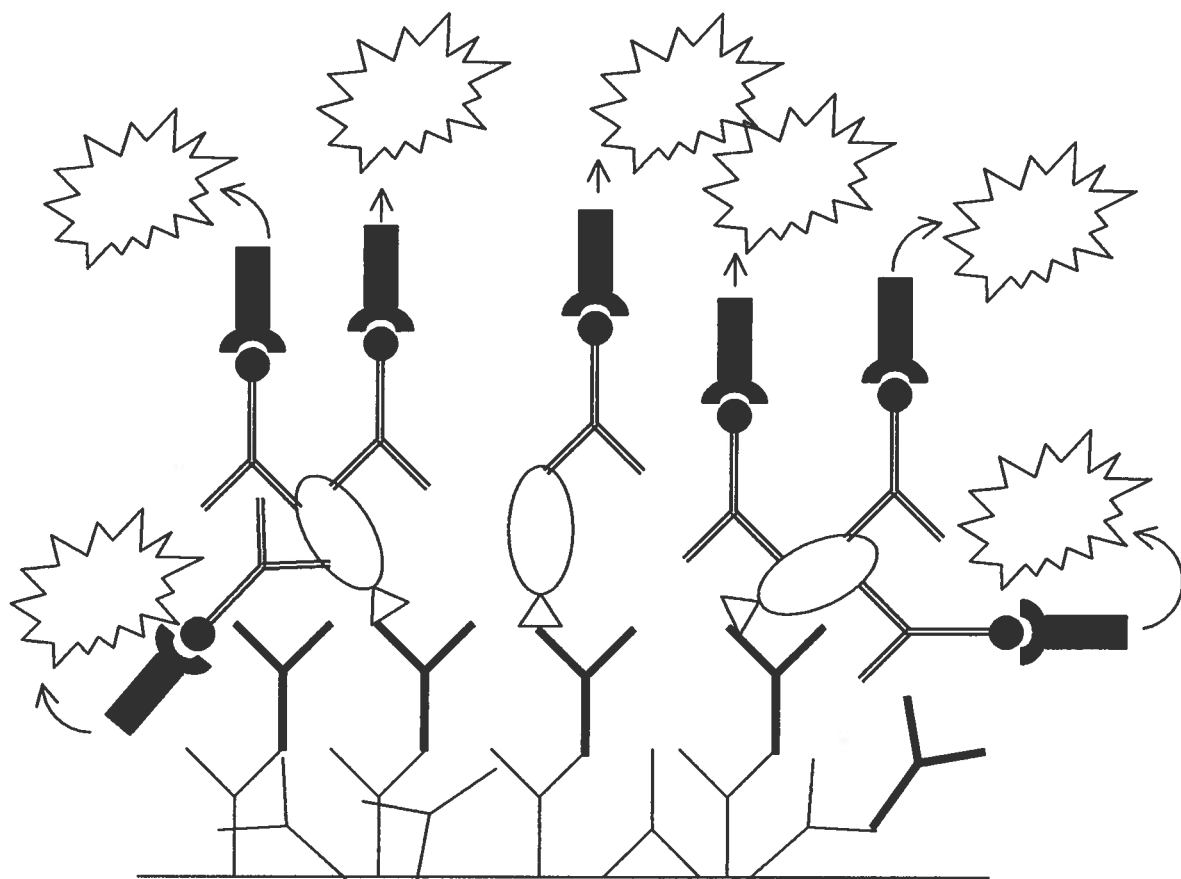
La séquence oligonucléotidique de l'insert a été confirmée après chaque production. Pour ce faire, 25 µl de phages dans le TBS ont été prélevés et l'ADN simple brin a été purifié par une extraction au phénol suivi d'une précipitation à l'éthanol. Le séquençage a été fait tel que décrit à la fin de la Section 6.5. Cette technique de purification des phages a été développée à partir d'une méthode publiée par Popkov et collaborateurs (1998).

7. ELISA

Cette technique est inspirée des publications de Valadon et Scharff (1996) et de Lijnen et collaborateurs (1997) et est illustrée à la Figure 4. Des plaques de 96 puits à fond plat (MaxiSorp™, Nunc distribuées par VWR CanLab, Mississauga, ON, Canada) ont été enrobées avec des Ig de chèvre spécifiques de la portion Fcγ des Ig de rat (3,8 µg/ml dans du PBS à raison de 50 µl par puits, Jackson Immunoresearch Laboratories inc, distribué par BIO/CAN scientifique, Mississauga, ON, Canada). Les plaques enrobées ont été gardées à 4°C jusqu'à utilisation (1 à 4 jours). Ensuite, les puits de la plaque ont été lavés trois fois avec du PBS additionné de 0,002% de Tween 80 (PBS-T), avant de bloquer les puits avec 200 µl de PBS-T additionné de 5% de lait écrémé pour un minimum de 2 h. Puis, 70 à 100 µl de surnageant de culture d'hybridome ou de sérum dilué de rat immunisé ont été ajoutés, suivi des phages. Les phages ont été testés par mélange d'un maximum de 8 phages. En fait, 5×10^9 virions de chaque phage recombinant ont été ajoutés à chacun des puits dans un volume total de 10 µl. La plaque a été incubée sous agitation à 4°C durant une nuit. Ensuite, les puits ont été lavés 7 fois avec du PBS-T et 75 µl d'anticorps de mouton biotinylé spécifique pour la protéine phagique M13 dilué 1/1000 avec du PBS-T ont été ajoutés aux puits (5 prime, 3 prime inc, Boulter, CO, USA). Après 30 min à la température de la pièce, les puits ont été lavés 5 fois et 100 µl de peroxydase couplée à la streptavidine (SA-HRP) ont été ajoutés à une dilution 1/4000 dans du PBS-T. La plaque a été incubée à la température de la pièce pendant 30 min. Finalement, après avoir lavé les puits 5 fois avec du PBS-T, 75 µl d'ABTS 0,05% (2.2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diamonium salt crystal, $C_{18}H_{16}O_6S_4-(NH_4)_2$) (Roche Molecular Biochemicals) dans du tampon citrate à pH 4,0 ont été ajoutés. Après 1 h d'incubation à la température de la pièce, les plaques ont été lues à l'aide d'un lecteur à plaque ELISA à 405 nm (EL309, Bio-tek instrument, Winooski, VT, USA).

Figure 4 : Test ELISA

Les surnageants d'hybridomes et les sérums des rats immuns ont été analysés par un test ELISA. Ce test est basé sur la reconnaissance par les immunoglobulines présentes dans les surnageants de culture d'hybridomes ou dans les sérums d'épitopes spécifiques du récepteur Ly49B exprimés par des phages recombinants.



anti IgG de rat
Fc-spécifique



phage
recombinant



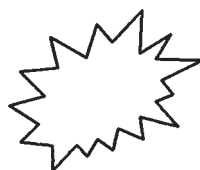
surnageant
de culture



SA-HRP



anti M13
biotinylé



ABTS oxydé

Il est à noter que la capacité des hybridomes à sécréter des Ig a aussi été analysée. Dans ces puits, aucun phage n'a été ajouté et l'AcMo anti-M13 a été remplacé par des Ig de chèvre biotinylées spécifiques pour les chaînes légères et lourdes des IgG de rat (Jackson ImmunoResearch Laboratories inc).

La mise au point de ce test a été faite avec l'AcMo de souris BCDF9 (F9) qui reconnaît le phage recombinant M1 qui exprime l'épitope dont la séquence est GRRPGGWWMR (Popkov *et al*; 2000). De plus, le phage CT1 a été utilisé comme témoin négatif. Ce dernier exprime la séquence QDRWDSKT qui est présente dans la tige du récepteur Ly49C, mais pas dans celle du Ly49B.

8. Marquage de cellules pour l'analyse en cytométrie

Au total, 2 à 3 x 10⁵ cellules ont été utilisées pour chaque marquage. Avant le début des marquages, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS (sans calcium ni magnésium) additionné de 1% de SVF et de 0,2% d'azoture de sodium (PBSc). Lorsque des cellules NK ou LAK ont été marquées, les récepteurs FcγRII/RIII de ces cellules ont été bloqués avec l'AcMo 2.4G2 (1 µg/3 x 10⁵ cellules) pendant 20 min à la température de la pièce. Ensuite, le premier anticorps a été ajouté dans un volume de 40 µl à la concentration optimale. Après 30 min sur glace et à 4°C, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBSc. Dans les cas où un deuxième anticorps devait être ajouté, il a été mis dans un volume de 40 µl et ajouté aux cellules (30 min, sur glace, 4°C). Lorsque le premier anticorps était biotinylé, le conjugué SA-PE a été ajouté (dilué 2/5 dans un volume de 15 µl). Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBSc et reprises dans 400 µl de paraformaldéhyde 1% (Gibco BRL). Les cellules ont été analysées à l'aide d'un cytofluoromètre Epics XL-MCL (Coulter, Hialeah, FL, USA).

Il est à noter que lorsque des cellules Jurkat ont été marquées, elles n'ont pas été bloquées avec l'AcMo 2.4G2, car ces cellules n'expriment pas de récepteur

Fc. De plus, à la fin du marquage ces cellules n'ont pas été fixées à la paraformaldéhyde, elles ont plutôt été reprise dans 400 µl de PBSc. Cependant, dans ce cas il fallait faire les lectures au maximum une heure après la fin du marquage.

9. Absorption de sérums

Certains sérums de rat ont été absorbés avec des cellules Jurkat parentales à raison de 50×10^6 cellules par absorption. Chacune de celles-ci a eu lieu à 4°C et sur glace pendant 30 min. Le sérum a été absorbé jusqu'à ce que sa réactivité avec les cellules parentales soit nulle.

D. Résultats

1. Immunisation d'animaux avec des cellules LAK

Pour atteindre le premier objectif de ce mémoire qui est la production d'anticorps monoclonaux spécifiques du récepteur Ly49B, des rats ont été immunisés avec des cellules LAK de souris CBA/J. Étant donné la grande hétérogénéité de l'immunogène, un test très sélectif de criblage des hybridomes a été mis au point.

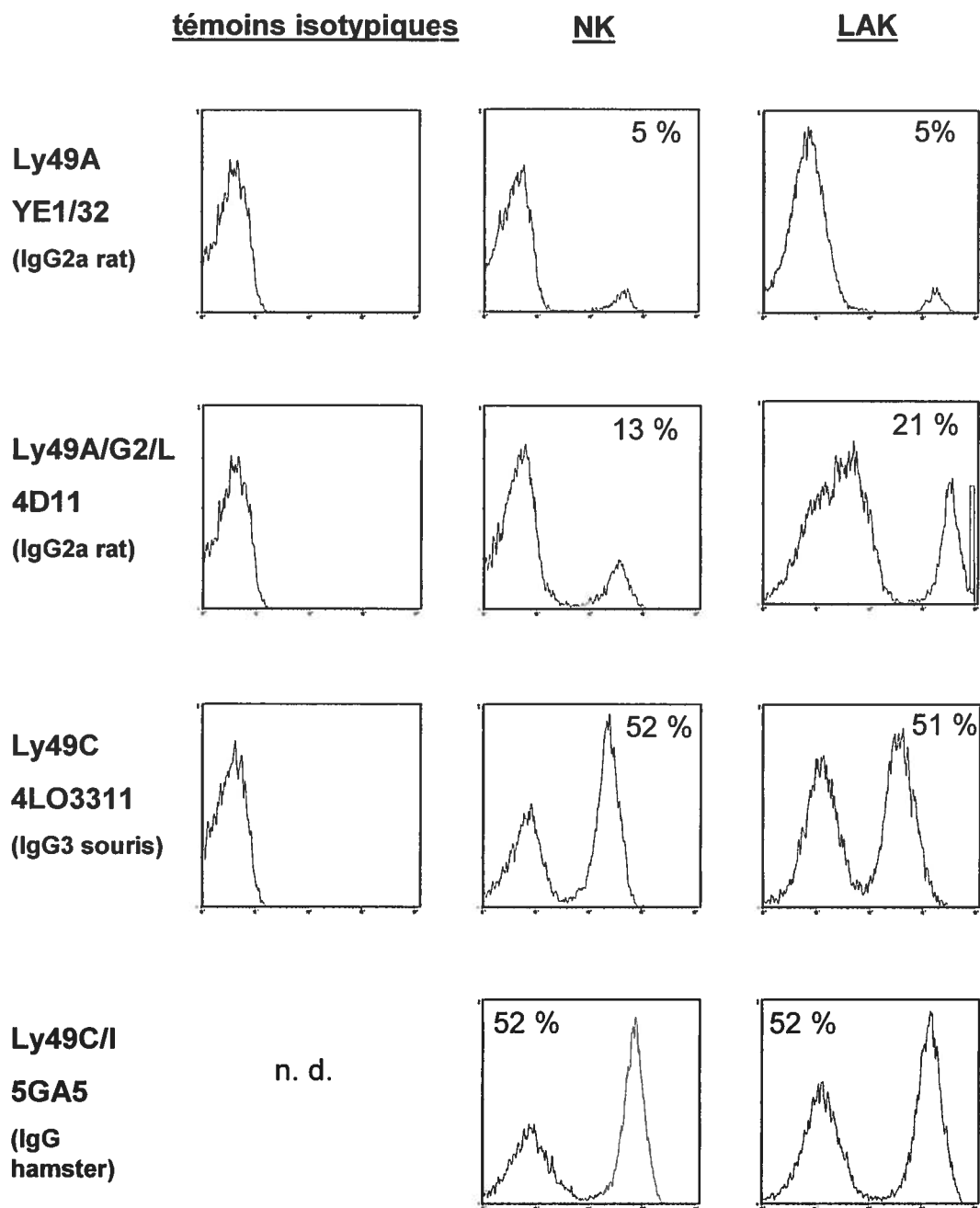
1.1 Phénotypage de cellules NK et LAK de souris CBA/J

L'expression des récepteurs Ly49 des cellules NK de souris CBA/J, cultivées ou non en présence d'IL-2, a été analysée à l'aide des anticorps anti-Ly49 disponibles. Les cellules LAK de la souche de souris CBA/J ont été choisies pour l'immunisation, car c'est dans un tissu provenant d'une souris de cette souche que la séquence du Ly49b a été trouvée en premier (Takei *et al*; 1997). Avec l'AcMo YE1/32, nous avons pu établir que le récepteur Ly49A est exprimé sur environ 5% des cellules NK/LAK spléniques de cette souche et que la population Ly49A⁺ ne change pas après une stimulation avec l'IL-2 (Figure 5). Par ailleurs, le niveau d'expression de ce récepteur est modulé à la hausse de façon significative sur les cellules LAK.

La réactivité des cellules de souris CBA/J avec l'AcMo 4D11 est plus complexe à analyser puisque cet AcMo reconnaît les récepteurs Ly49A, Ly49G2 et Ly49L, tous présents chez cette souche de souris (Tableau 2 et 3). Nous pouvons seulement affirmer que 13% des cellules NK de souris CBA/J expriment soit les récepteurs Ly49A, Ly49G2 ou Ly49L uniquement, ou une combinaison de deux ou trois de ces récepteurs (Figure 5). La réactivité des cellules LAK avec cet AcMo est encore plus complexe, car il y a apparition d'une population de cellules qui expriment un niveau faible de récepteur(s) reconnu(s) par l'AcMo 4D11. C'est seulement lorsque des AcMo spécifiques pour chacun de ces récepteurs Ly49 seront disponibles que le phénotypage des cellules NK et LAK par rapport à ces récepteurs chez la souris CBA/J pourra être démystifié.

Figure 5 : Phénotypage des cellules NK et LAK de souris CBA/J

L'expression des récepteurs Ly49 de cellules NK et LAK a été analysé par cytométrie en flux à l'aide des AcMo YE1/32 (Ly49A), 4D11 (Ly49A/G2/L), 4LO3311 (Ly49C) et 5GA5 (Ly49C/I). Le pourcentage indiqué correspond au nombre relatif de cellules positives pour chaque marqueur. (n.d.) : témoin isotypique non-disponible



L'expression des récepteurs Ly49C et Ly49I a été analysée avec les AcMo 4LO3311 (Ly49C) et 5GA5 (Ly49C/I) (Figure 5). Étant donné que ces deux AcMo se lient à 52% des cellules, le récepteur Ly49I, ou à tout le moins l'allèle reconnu par l'AcMo 5GA5, n'est vraisemblablement pas exprimé sur les cellules NK et LAK des souris CBA/J. De plus, l'IL-2 ne semble avoir aucun effet sur le niveau d'expression du récepteur Ly49C chez cette souche de souris, car l'intensité de fluorescence moyenne des cellules est comparable dans les deux conditions.

En bref, ces résultats démontrent que la suspension cellulaire utilisée pour immuniser les rats est constituée de sous-populations exprimant des niveaux variables de récepteurs Ly49. Le choix d'un système de criblage très sélectif s'impose donc, car plusieurs autres récepteurs Ly49 homologues au récepteur Ly49B présents dans l'immunogène peuvent aussi induire la production d'anticorps par l'animal immunisé. Chez la souris C57BL/6, les récepteurs Ly49A et Ly49C sont chacun exprimés sur des sous-populations représentant environ 20% et 30% des cellules NK, respectivement (Gosselin *et al*; 1997, Kubota *et al*; 1999). L'AcMo 4D11 qui reconnaît les récepteurs Ly49A et Ly49G2 sur les cellules NK de cette souche de souris se lie quant à lui à environ 45% des cellules NK (Kubota *et al*; 1999). Ces exemples d'expression montrent bien à quel point les sous-populations de cellules NK varient d'une souche de souris à l'autre. Dans cette même étude, il a été déterminé que le récepteur Ly49B ne serait que faiblement exprimé sur les cellules NK de la souris C57BL/6, nous espérons qu'en utilisant des cellules NK provenant de la souche de souris à partir de laquelle le gène *Ly49b* a été cloné en premier nous aurions accès à une plus grande sous-population de cellules qui expriment ce récepteur. Il est toutefois important de noter que l'expression du récepteur Ly49B n'a pas été vérifiée chez la souris CBA/J. Durant la réalisation de ce projet, 3 autres allèles du récepteur Ly49B ont été identifiés par d'autres laboratoires (GenBank #AAF67737, #AAF67738, #AAL12939). L'allèle C57BL/6 est identique à 99% à l'allèle 129/SvJ et à 96% aux allèles BALB/c et CBA/J qui eux sont équivalents, il

sera ainsi intéressant de comparer, avec l'anticorps produit, la taille des sous-populations Ly49B⁺ chez ces différentes souches de souris.

Enfin, nos résultats montrent aussi que la culture des cellules NK en présence d'IL-2 ne nuit pas à l'expression des récepteurs Ly49. Ces conditions de culture sont donc un bon moyen pour obtenir suffisamment de cellules pour l'immunisation des rats à partir d'un nombre restreint de souris.

1.2 Production de phages recombinants

Après avoir bien analysé la séquence protéique du récepteur Ly49B, sept séquences de huit acides aminés ont été identifiées comme épitopes potentiels pour un AcMo spécifique du récepteur Ly49B, car celles-ci se retrouvent seulement chez ce récepteur (Figure 3). Ainsi, 7 phages recombinants qui expriment ces séquences uniques au récepteur Ly49B ont été produits selon la méthode décrite à la Section C.6. Après chacune des productions, l'intégrité de l'insert de chacun des phages a été confirmée par séquençage. Seul le phage BC2 contient un polymorphisme. En effet, le résidu glutamine dans la séquence Ly49B des souris BALB/c et CBA/J est remplacé par un résidu glutamate dans la séquence des souris C57BL/6 et 129/SvJ. Il sera donc théoriquement possible d'isoler un anticorps spécifique d'allèle avec ce phage.

1.3 Mise au point du test ELISA

Afin d'effectuer chacun des tests de façon optimale, différentes concentrations d'AcMo de souris, d'anti-M13 et de phages ont été testées. D'abord, des concentrations variables de l'anticorps F9 ont été testées en présence d'AcMo anti-M13 dilué 1/1000 et 1/3000 (Figure 6A). Lorsque l'AcMo anti-M13 est utilisé à une dilution 1/1000, il est possible de détecter des anticorps spécifiques lorsqu'ils sont à une concentration égale ou supérieure à 100 ng/ml. Au-dessous de cette concentration, la DO obtenue se confond avec celle du bruit de fond. Trois gammes de phages M1 et CT1 ont ensuite été testées (Figure 6B).

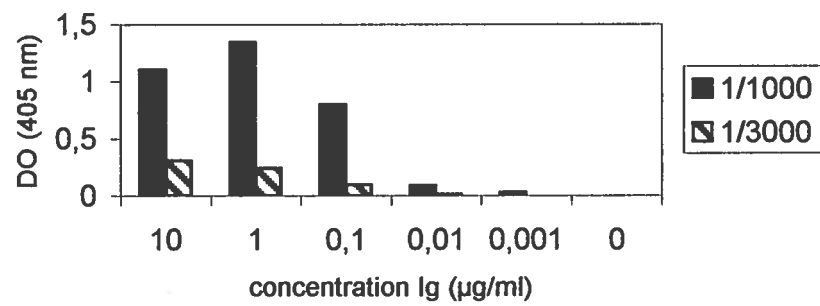
Figure 6 : Mise au point du test ELISA

Plusieurs paramètres du test ELISA ont été analysés :

- A) Deux dilutions d'AcMo anti-M13 ont été testées en présence de 2×10^{10} phages M1 et d'une gamme d'AcMo F9 variant de 0 à 10 µg/ml.
- B) Trois gammes de phages ont été testées (de 5×10^9 à 1×10^{11} phages) en présence de 100 ng/ml de l'AcMo F9 : une gamme avec le phage M1 qui exprime l'épitope de l'AcMo F9, une autre avec le phage CT1 qui exprime un épitope du récepteur Ly49C (témoin négatif) et une dernière avec un mélange de ces 2 phages. Dans ce dernier cas, 5 à 35×10^9 phages non-spécifiques CT1 ont été ajoutés à 5×10^9 phages M1. La DO obtenue pour chaque analyse est notée par rapport au nombre total de phages dans chaque puits.
- C) Un volume variable d'AcMo anti-M13 de 50 à 170 µl a été testé en présence de 5×10^9 phages de chacun des 8 phages présents dans le groupe de virions utilisé et de 100 µl d'une dilution 1/1000 du sérum A3-2.

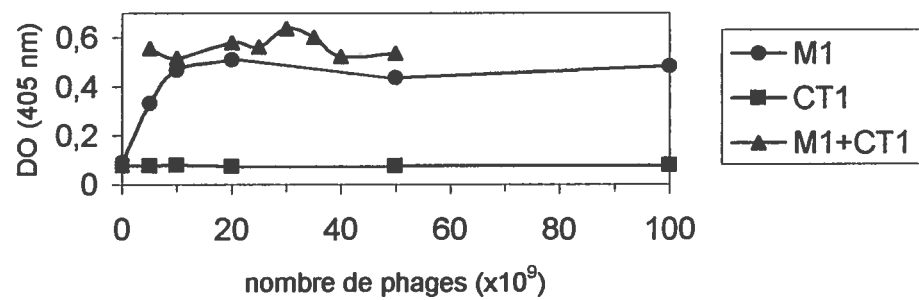
A)

Dosage de l'anti-M13



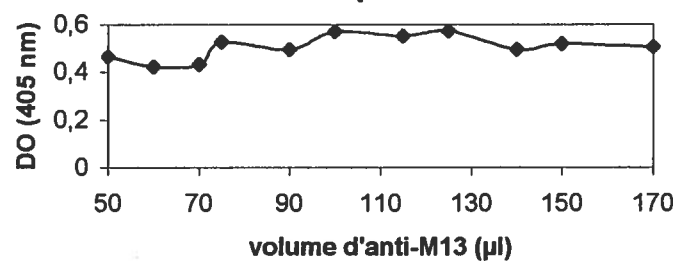
B)

Dosage de la quantité de phages



C)

Évaluation du volume minimal d'anticorps anti-M13



La gamme de phage M1 a servi à déterminer la quantité minimum de phages qui peuvent être utilisés par puits lors d'un test. Les résultats montrent qu'un signal clair est atteint à 5×10^9 phages et qu'un plateau est vite obtenu. La gamme CT1 permettait de vérifier la spécificité du test. Les résultats démontrent que quelle que soit la quantité de phages non-spécifiques dans un puits, la DO reste toujours au niveau du bruit de fond initial. Finalement, l'effet de l'encombrement stérique entre les phages spécifiques et non-spécifiques a aussi été évalué avec 5×10^9 phages M1 mélangés avec un nombre variable de phages CT1. La Figure 6B montre bien qu'aucun encombrement stérique ne survient et qu'il est possible de mélanger jusqu'à huit phages différents (à une concentration de 5×10^9 phages chacun) pour chaque test sans qu'il y est chute décelable de la DO. Cette observation est importante en ce qui à trait à l'efficacité du test. En effet, les surnageants d'hybridomes n'ont pas besoin d'être testés contre tous les phages individuellement, puisque la présence d'un anticorps spécifique contre un seul parmi huit phages recombinants pourra être décelée dans une seule analyse. Finalement, après quelques mois d'utilisation, nous avons analysé une gamme de volumes d'AcMo anti-M13 afin de diminuer les coûts du test (Figure 6C). Le sérum A3-2 qui réagit fortement contre tous les phages recombinants produits a été utilisé pour cette analyse (voir Section 1.4 et Figure 7B). Aucune différence dans la densité optique obtenue n'a été observée quel que soit le volume d'AcMo anti-M13 ajouté. Afin de nous assurer que ce paramètre ne soit pas un facteur limitant lors de la détection d'Ig spécifiques, nous avons retenu le volume de 75 μ l pour les tests ultérieurs. Ceci représente une économie de plus de la moitié de l'AcMo anti-M13, dont le coût est assez élevé.

1.4 Immunisation et analyse de sérums

Les animaux A1 à A9 ont été immunisés avec des cellules LAK selon le protocole décrit au Tableau 6. Il est à noter que ces animaux ont été immunisés en deux groupes. D'abord, les rats F344 A1 à A3 ont été immunisés et leurs cellules spléniques ont été utilisées pour les fusions. Dans un deuxième temps, les rats F344 A4 à A6 et DA A7 à A9 ont été immunisés. Avant chaque immunisation, le

pourcentage de cellules qui expriment le récepteur Ly49C a été vérifié par une analyse de cytométrie en flux avec l'AcMo 4LO3311 (résultats non-illustrés). Il s'agit d'un paramètre convenable pour vérifier la qualité des suspensions cellulaires utilisées pour l'immunisation puisque la fréquence des cellules Ly49C⁺ chez la souris CBA/J est de l'ordre de 45-55% (Figure 5). L'AcMo PK136 qui reconnaît le récepteur NK1.1 (CD161c) exprimé sur la majorité des cellules NK de la souris C57BL/6 ne pouvait être utilisé puisque cet antigène ou l'allèle de cet antigène reconnu par l'AcMo PK136 n'est pas exprimé chez les souris CBA/J. Le seul autre AcMo anti-NK qui aurait pu être utilisé est le DX5, mais il n'était pas disponible dans le laboratoire au moment de cette étude.

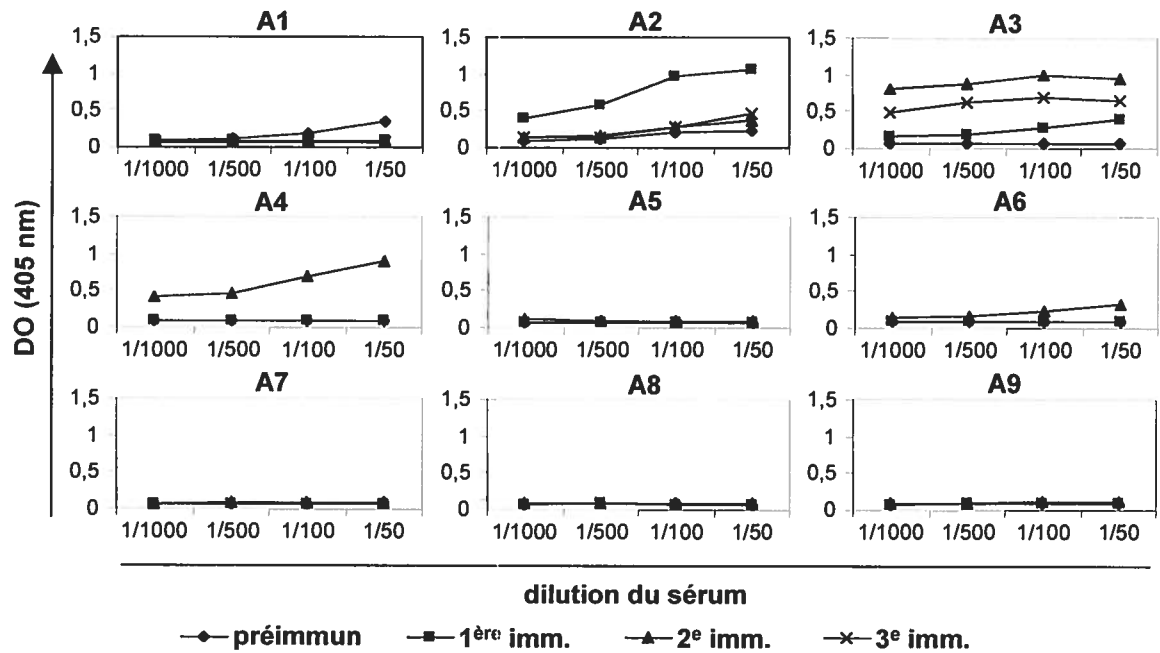
La réaction des animaux à l'immunogène a d'abord été analysée par cytométrie en flux. Tous les rats ont réagi à l'immunisation, car leur sérum contient des anticorps qui réagissent avec les cellules LAK alors qu'aucune réactivité n'a été observée avec les sérums préimmuns (résultats non-illustrés).

Les sérums ont aussi été analysés par ELISA contre un mélange de phages composé des phages recombinants contenant des inserts spécifiques du récepteur Ly49B (BT, BC, BC2 et BC3) et de quatre autres phages spécifiques d'autres récepteurs Ly49 (Figure 7A). Le sérum du rat A3 prélevé après la 2^e immunisation (A3-2) est très intéressant, car même lorsqu'il est dilué 1000 fois, il réagit toujours fortement contre le groupe de phages. Nous avons fait l'hypothèse que ce rat avait réagi contre un épitope spécifique exprimé sur un phage recombinant, mais lorsque nous avons repris l'analyse avec chaque phage individuellement, le sérum a réagi avec tous les phages (résultats non-illustrés). Malgré cette déception, le sérum A3-2 a tout de même été d'une grande utilité, car il pouvait maintenant servir de témoin positif pour les ELISA avec des Ig de rat. Le sérum des rats A2, A4 et A6 a aussi réagi contre tous les phages. Cependant, les sérums immuns des animaux A1, A5, A7, A8 et A9 n'ont pas réagi contre le mélange de phages utilisé. Toutefois, il est possible que des

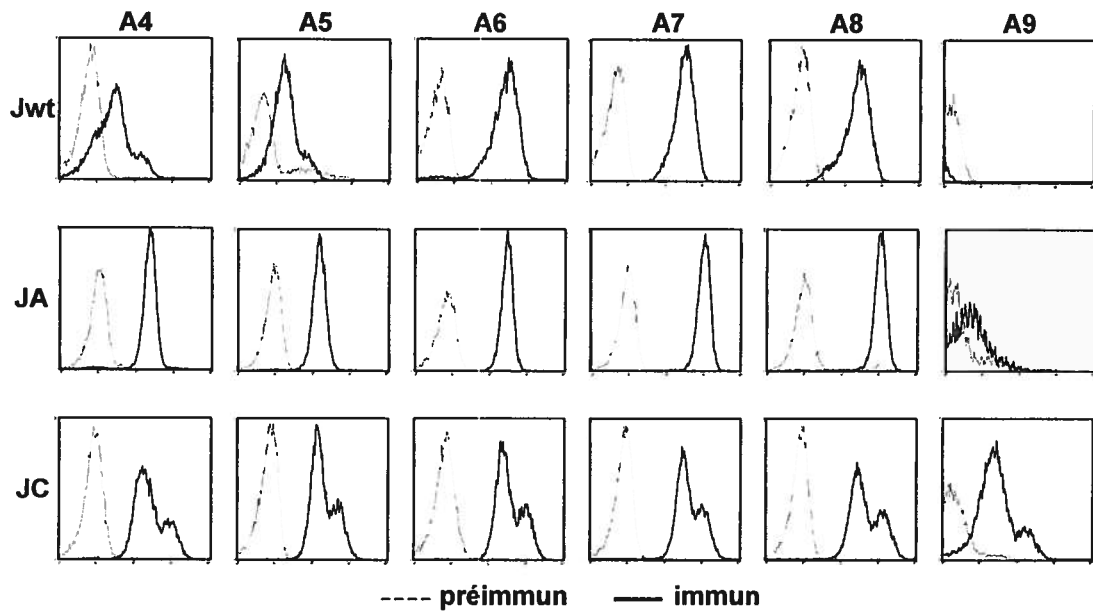
Figure 7 : Analyse des sérums des rats A1 à A9

- A) Les sérums prélevés après chaque immunisation des rats A1 à A9 ont été testés en ELISA contre le groupe de phage qui inclut les phages BT, BC, BC2 et BC3. L'analyse a été faite en duplicata avec 4 dilutions de chacun des sérums. Les sérums préimmuns ont été utilisés comme témoins négatifs.
- B) Les sérums des rats A4 à A9 (dilution 1/100) ont été analysés par cytométrie en flux contre les cellules Jurkat de type parentale (Jwt) et les cellules transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49A (JA) ou Ly49C (JC). Pour tous les rats sauf A9, les résultats illustrés correspondent aux sérums prélevés après la 3^e immunisation. Pour A9, le sérum analysé a été prélevé après la 2^e immunisation. Les sérums préimmuns ont été utilisés comme témoins négatifs.

A)



B)



anticorps spécifiques du récepteur Ly49B soient présents en trop faible quantité dans le sérum de ces rats pour être détectés par ce test. Les résultats présentés dans la Figure 5 nous ont permis d'établir que 50% des cellules NK et LAK de souris CBA/J exprimaient le récepteur Ly49C alors que dix fois moins de cellules exprimaient le récepteur Ly49A. Selon les analyses d'ARNm effectuées par Kubota et collaborateurs (1999) et Takei et collaborateurs (2001), le pourcentage de cellules qui expriment le récepteur Ly49B devrait être encore plus faible. Pour confirmer l'immunogénicité des récepteurs Ly49 dans le protocole d'immunisation utilisés, nous avons évalué par cytométrie en flux la réactivité des sérums de rats immuns encore vivants avec les cellules lymphomateuses T humaines de la lignée Jurkat J77.6 de type parental (Jwt) ou transfectées avec les ADNc des récepteurs Ly49A (JA) et Ly49C (JC) qui étaient disponibles dans le laboratoire suite à une autre étude en cours (Chalifour *et al*; manuscrit soumis pour publication). Tous les sérums ont réagi fortement avec les cellules transfectées mais malheureusement une réactivité d'intensité variable a aussi été observée pour la majorité des sérums avec les cellules Jwt (Figure 7B). Celle-ci est sans doute la conséquence du partage d'épitopes entre des molécules humaines et murines co-exprimées par les cellules NK et les lymphocytes T. Le sérum du rat A9 est le seul qui ne réagit pas avec les cellules Jurkat de type parental. Il réagit par ailleurs fortement avec les cellules transfectées avec le Ly49C et plus faiblement avec celles transfectées avec le Ly49A.

Ainsi donc, malgré que des anticorps anti-Ly49B n'aient pas été décelés dans le sérum immun du rat A9 par le test ELISA, on peut tout de même conclure que ce rat a par ailleurs réagi avec d'autres récepteurs Ly49 exprimés sur les cellules NK utilisées pour l'immunisation.

Les rats A3, A2, A9 et A6 dont les sérums immuns présentent un certain intérêt ont été utilisés dans l'ordre pour la production d'hybridome. Malheureusement, le rat A4 étant mort en cours d'expérimentation, il n'a pu être utilisé.

1.5 Fusions et criblage

Le rat A3 ayant donné la plus forte réponse a été choisi pour la première fusion. La fusion des cellules spléniques du rat avec le myélome P3X63Ag8.653 a donné 705 puits qui contenaient des hybridomes (soit 93% des puits ensemencés) (Tableau 8). Seulement 52% de ces puits ont atteint une croissance suffisante pour être testés par ELISA, mais aucun surnageant n'a réagi contre les phages recombinants testés. Au moment où cette fusion a été faite, nous ne disposions que de trois phages spécifiques du récepteur Ly49B soit BT, BC et BC2 (voir Figure 3 pour l'identification et la localisation des épitopes).

Étant donné que seulement 52% des puits qui avaient des hybridomes ont atteint une croissance assez grande pour permettre un test de criblage, nous avons voulu essayer un autre partenaire de fusion. Ainsi pour la fusion A2, le partenaire de fusion SP2/0-Ag14 a été utilisé. De plus, le milieu de sélection HAT, a été ajouté seulement 24 h après la fusion comme le suggère le protocole décrit dans CPI plutôt qu'immédiatement après la fusion. Avec ces nouvelles conditions, nous avons obtenu 61% des puits qui contenaient des hybridomes (soit 407 puits), mais seulement 41% de ceux-ci ont atteint une confluence suffisante pour être testés (Tableau 8). Les hybridomes ont été testés contre le même groupe de phages que la fusion A3. À notre grande surprise, seulement 2 des 167 hybridomes testés (1,2%) sécrétaient des Ig et celles-ci n'ont pas retenu de phages dans le test ELISA (Tableau 8).

Étant donné qu'encore une fois la croissance des hybridomes et leur capacité de sécréter des Ig étaient insatisfaisantes, nous avons décidé de changer une fois de plus de partenaire de fusion. Ainsi, des cellules P3X63Ag8.653 provenant d'une autre source ont été utilisées. De plus, comme certains protocoles de

Tableau 8 : Analyse des hybridomes des fusions A3, A2, A9 et A6

fusion	% puits avec hybridomes	% hybridomes testés	% hybridomes sécréteurs	hybridomes spécifiques
A3	93	52	n.d.	0
A2	61	41	1	0
A9	46	84	30	0
A6	96	93	75	0

fusion omettent le choc osmotique sur les cellules spléniques (Bazin; 1990), nous avons donc supprimé cette étape pour la fusion effectuée avec les cellules spléniques du rat A9. Lors de cette fusion, le HAT n'a aussi été ajouté que 24 h après la fusion afin de laisser un répit aux cellules. Cette fusion a donné des hybridomes dans 46% des puitsensemencés (soit 223 puits) et 84% de ceux-ci ont été testés (Tableau 8). Dans cette fusion, 30% des hybridomes testés sécrétaient des Ig, mais aucune de celles-ci n'était spécifique pour les séquences du récepteur Ly49B insérées dans les phages BT, BC, BC2 et BC3. Le phage BC3 a été produit suite à l'échec d'identification d'un hybridome producteur d'AcMo anti-Ly49B après les 2 premières fusions. Cette séquence située dans l'extension de 20 acides aminés à l'extrémité carboxyterminale du récepteur a été utilisée pour la préparation d'un nouveau phage recombinant afin d'augmenter les chances de succès.

Deux autres phages recombinants exprimant deux autres séquences cibles de la région CRD du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B ont été ajoutés au mélange test pour les fusions subséquentes (BC4 et BC5). La fusion des cellules spléniques du rat A6 a été faite selon le même protocole que la fusion précédente. Cette fusion a généré 888 hybridomes (96% des puitsensemencés) et 93% de ceux-ci ont été testés (Tableau 8). 75% des hybridomes testés sécrétaient des Ig mais aucune ne reconnaissait un des phages BT, BC, BC2, BC3, BC4 et BC5.

En résumé, lors des 4 fusions entre les cellules spléniques de rats immunisés avec des cellules LAK et différents partenaires de fusion, 1550 hybridomes ont été analysés. Parmi les hybridomes testés, 57% produisaient des Ig. Toutefois, même si deux souches de rats ont été utilisées et que la dose de cellules inoculée, la voie d'immunisation et le nombre de rappels ont varié, aucun hybridome produisant un anticorps spécifique du récepteur Ly49B n'a pu être identifié. Par ailleurs, plusieurs phages ont été ajoutés au mélange de criblage au cours de ces fusions afin de maximiser les chances d'obtenir l'hybridome

d'intérêt. Ces séquences auraient été des épitopes parfaits pour un AcMo qui se lie au récepteur Ly49B, car elles sont seulement présentes chez ce récepteur.

Il est à noter qu'afin de ne pas éliminer par erreur un hybridome intéressant chaque test de sécrétion d'Ig et de spécificité pour les phages a été effectué au moins trois fois avant de jeter un hybridome non-sécréteur ou non-spécifique.

2. Production du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B

L'incapacité de sélectionner un hybridome produisant un AcMo spécifique du récepteur Ly49B à partir des 1550 obtenus lors des fusions effectuées avec les cellules spléniques de rats immunisés avec des cellules LAK, nous a amenés à conclure que ce récepteur était probablement exprimé trop faiblement dans l'organe à partir duquel les cellules LAK ont été produites (Kubota *et al*; 1999, Takei *et al*; 2001). Nous avons donc pensé qu'il serait intéressant d'immuniser les animaux avec le domaine extracellulaire soluble du récepteur Ly49B produit en utilisant la trousse d'Invitrogen « EasySelect Pichia expression kit ». Dans ce système, la séquence nucléotidique du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B est clonée en aval du peptide signal du facteur α de *Saccharomyces cerevisiae*, cette protéine de fusion étant sous le contrôle du promoteur inducible au méthanol de l'alcool oxidase 1 (AOX1) (voir Annexe 2). De plus, la présence des étiquettes c-myc et 6xHis en aval de la protéine de fusion peut servir à sa détection et sa purification. Ce système d'expression de protéines est très avantageux, car il est peu coûteux et étant donné que les levures *P. pastoris* ne sécrètent que très peu de protéines endogènes, la protéine sécrétée est déjà assez purifiée. Cette partie du projet a été réalisée avec la collaboration du Dr François Shareck du centre de recherche en microbiologie et biotechnologie de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

2.1 Clonage dans le vecteur pPICZ α

L'amplification par PCR du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B à partir du vecteur pBCMGS-Ly49B a donné un fragment d'ADN d'une longueur de 660 pb. Le fragment a ensuite été cloné à l'intérieur du vecteur pPICZ α A tel que mentionné à la Section C.2.1. Après la transformation de bactéries TOP10F' avec l'ADN, plus de 300 colonies résistantes à la zéocine ont été obtenues et la présence du plasmide pZ α 49b a été analysée dans 24 colonies. Ceci a été déterminé par une digestion de l'ADN par les enzymes *KpnI* et *XbaI*. Toutes les colonies analysées contenaient le plasmide recombinant (résultats non-illustrés). L'intégrité de la séquence nucléotidique de l'ADN pZ α 49b19 à partir du promoteur de l'AOX1 jusqu'à la fin de l'étiquette 6xHis a été confirmée par séquençage. Ceci étant établi, nous avons pu procéder à la transformation de levures *Pichia pastoris*.

2.2 Transformation de levures *P. pastoris* et analyse de sécrétion

Afin d'obtenir une souche de levure qui sécrète la protéine tronquée du récepteur Ly49B, les souches sauvages de levures *Pichia pastoris* X-33 et KM71H ont été transformées avec de l'ADN pZ α 49b linéarisé avec l'enzyme *SacI*. Ce clivage qui a lieu dans le promoteur de l'AOX1 permet l'intégration de l'ADN qui code pour la protéine de fusion à l'intérieur du génome de la levure transformée par recombinaison homologue. Les témoins négatif et positif de chacune des transformations étaient des levures transformées respectivement avec de l'eau stérile ou le vecteur sauvage. Les particularités de chacune des transformations sont résumées dans le Tableau 9.

La première transformation a été effectuée selon les recommandations du manufacturier. Malheureusement, aucun transformant n'a été obtenu après 2 à 3 jours d'incubation à 30°C. Étant donné que la préparation de levures électrocompétentes que propose le manuel d'instruction de la trousse donne des

Tableau 9 : Transformation de levures *P. Pastoris* avec pZ α 49b

transformation	commentaires	colonies obtenues		
		H ₂ O	pPICZ α A	pZ α 49b
1	selon le manuel	0	0	0
2	selon McGill	0	0	0
3	selon McGill vecteur commercial	0	0	0
4	selon McGill, gamme de zéo 75, 50, 25, 10 μ g/ml	0	61	53
5	selon McGill incubation 10 jours	0	0	0
6	selon McGill nouvelle prep. ADN incubation 14 jours	0	0	0
7	selon le manuel incubation 10 jours	7	18	4
8	selon le manuel incubation 10 jours	0	20	9
9	transformation chimique	0	0	0
10	Avec l'avis du Dr Denis Bourque, selon le manuel 5 et 10 μ g ADN 12 clones pZ α 49b 50 μ g/ml zéocine incubation 3 à 4 jours	0	0	24

Les levures électrocompétentes X-33 et KM71H ont été préparées soit selon les instructions du manuel d'Invitrogen soit selon un protocole utilisé lors d'un stage à l'université McGill. Plusieurs changements dans le protocole de transformation ont été faits, ceux-ci sont notés dans la colonne commentaires. Les nombres de colonies transformées des souches de levures X-33 et KM71H ont été groupés afin de simplifier le tableau.

suspensions très concentrées et par conséquent difficiles à manipuler, nous avons fait une préparation de levures comme j'avais appris à le faire lors d'un stage à l'université McGill. Ce protocole est identique à celui décrit dans le manuel d'instruction d'Invitrogen, à l'exception que la culture de départ est beaucoup plus diluée. Cependant, cette nouvelle procédure n'a pas été plus efficace. Nous avons donc mis en doute la qualité de l'ADN. Ainsi, la troisième transformation a été faite avec 5 µg de vecteur pPICZαA provenant de la trousse de départ acheté d'Invitrogen au lieu d'une préparation maison de vecteur parental. Malheureusement, aucune colonie de levure résistante à la zéocine n'a poussé. Étant donné que la qualité de l'ADN ne semblait pas être le problème, nous avons fait un test de croissance de la levure témoin résistante à la zéocine GS115/pPICZ/lacZ (Tableau 5). Nous avons été surpris de constater qu'il fallait diluer la zéocine 10 fois (10 µg/ml) pour obtenir des colonies isolées de levures après 2 à 3 jours d'incubation. Ainsi, pour la quatrième transformation, nous avonsensemencé le produit de la réaction de transformation sur des pétris contenant des concentrations variables de zéocine. Après 2 à 3 jours d'incubation, 61 colonies de levures contenant l'ADN pPICZαA et 53 colonies avec l'ADN pZα49b ont été obtenues dont la majorité étaient sur les pétris contenant seulement 10 µg/ml de zéocine. La capacité des transformants pZα49b à sécréter une protéine d'environ 30 kDa en conditions réductrices a alors été analysée. Malheureusement, aucune protéine de cette taille n'a été détectée, que ce ne soit par une coloration du gel au bleu de Coomassie ou par un immunobuvardage de type Western avec l'AcMo de souris anti-6xHis.

Afin d'obtenir des solutions à nos difficultés, nous avons fait appel au service d'assistance technique d'Invitrogen. La réponse a été très surprenante. En effet, monsieur Joe Rogers nous a appris que nous devions attendre de 7 à 10 jours après chaque transformation avant d'apercevoir des colonies résistantes à la zéocine, plutôt que 2 ou 3 jours comme il était mentionné dans leur manuel d'instruction.

Ainsi les cinquième et sixième transformations ont été faites en incubant les géloses pendant 10 et 14 jours, respectivement. Cependant, aucun transformant n'était visible. Avant de solliciter à nouveau l'avis du conseiller technique, une deuxième tentative de production de levures électrocompétentes selon les instructions du manuel a été faite. Cette transformation a donné 4 transformants pZ α 49b, mais aucune protéine sécrétée de la taille voulue n'a été observée lors des analyses de sécrétion. Cependant, l'utilisation du témoin GS115/Albumine a montré que la technique d'induction du promoteur avec le méthanol fonctionnait très bien (résultats non-illustrés).

Afin d'obtenir plus de transformants à analyser, une huitième transformation a été faite. Cette fois-ci, tout le produit de la réaction de transformation a étéensemencé sur un pétri contenant 100 μ g/ml de zéocine. Cette stratégie a porté fruit, car 9 colonies de levures résistantes à la zéocine transformées avec le vecteur pZ α 49b ont été obtenues. Cependant, une fois de plus, aucune protéine de la taille désirée n'a été détectée et ce même avec une coloration du gel au nitrate d'argent. Étant donné la faible efficacité de transformation des levures, la neuvième transformation a été faite selon le protocole de transformation chimique décrit dans le manuel d'instruction d'Invitrogen. Malgré cette nouvelle approche, aucune colonie n'a été obtenue. Finalement, nous avons demandé l'avis du Dr Denis Bourque (IRB, Montréal, Qc, Canada) qui utilise ce système d'expression. Le Dr Bourque nous a dit qu'il préparait les levures de la façon décrite dans le manuel d'instruction. Cependant, il transforme celles-ci avec 5 et 10 μ g d'ADN et ensemence des pétris contenant 50 μ g/ml zéocine. Ainsi, il obtient des résultats après 3 à 4 jours d'incubation, mais ceux-ci sont très variables, car pour un même clone d'ADN il obtient parfois 6 colonies, mais d'autres fois jusqu'à 75. La dernière transformation a donc été faite en suivant ses conseils. Chaque souche de levures a été transformée avec 5 et 10 μ g d'ADN et ceci a été fait avec 12 clones pZ α 49b différents. Après une incubation de 3 à 4 jours sur des géloses contenant 50 μ g/ml de zéocine, 24 transformants ont été obtenus. L'analyse de sécrétion de protéine après 24 h d'induction au

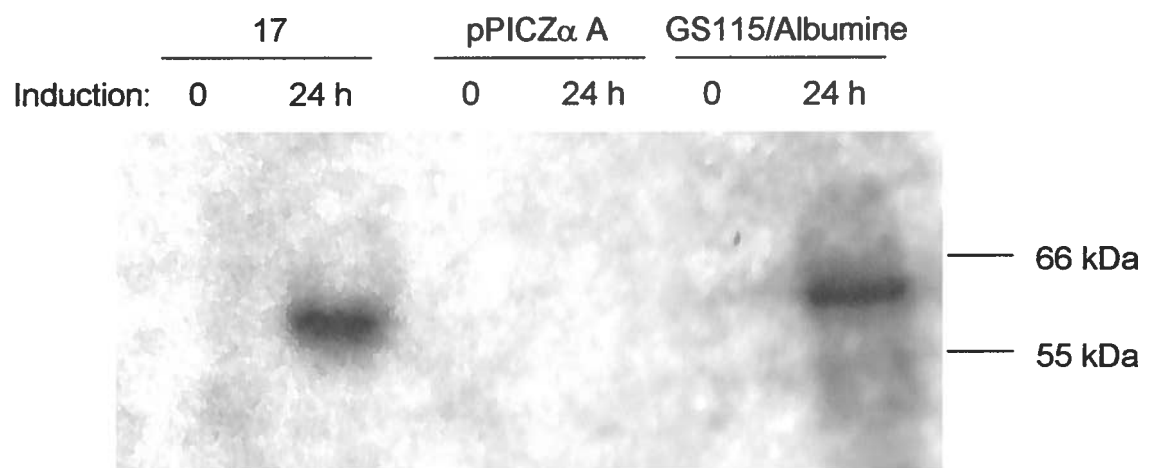
méthanol a révélé une protéine d'environ 60 kDa dans le surnageant du transformants 17 (Figure 8).

Ce clone correspond à la transformation de levures de la souche KM71H avec 10 µg de l'ADN pZ α 49b4. De plus, cette protéine n'apparaît pas dans le surnageant de culture au jour 0 de ce clone ni dans celui des levures transformées avec le vecteur sauvage. Afin de confirmer l'identité de la protéine, les protéines présentes dans les surnageants de culture prélevés lors de la cinétique d'induction de la protéine ont été visualisées par un gel de polyacrylamide et un immunobuvardage de type Western. Malheureusement, aucune protéine n'a pu être identifiée, car la bande d'intérêt n'était plus visible (résultat non-illustrés). Étant donné qu'il était possible que la protéine obtenue la première fois soit très sensible au cycle de congélation et de décongélation, un surnageant frais de production de protéine a été analysé en immunobuvardage de type Western. De plus, un échantillon de protéines précipitées à l'acétone a été chargé dans ce gel, mais aucune protéine de 60 kDa n'a été détectée que ce soit par une coloration au bleu de Coomassie ou par immunodétection avec l'AcMo anti-6xHis.

En résumé, 90 transformants pZ α 49b de levures ont été analysés, mais aucun de ceux-ci ne sécrétait une forme stable du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B. Étant donné le grand nombre de raisons possibles à cet échec (voir la Discussion) et les résultats préliminaires encourageants obtenus entre-temps suite à l'immunisation d'animaux avec des cellules transfectées (Section 3), nous avons abandonné cette piste.

Figure 8 : Production du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B

La capacité de chaque transformant à sécréter le domaine extracellulaire du récepteur Ly49B a été analysée suite à une induction de la production au méthanol. Les surnageants ont été analysés par SDS-PAGE 10% en conditions non-réductrices et les résultats ont été visualisés par une coloration au bleu de Coomassie. Une protéine d'environ 60 kDa est présente dans le milieu de culture du transformant 17 après 24 h d'induction. Des levures transformées avec le vecteur parental pPICZ α A ont été utilisées comme témoin négatif et la levure GS115/Albumine a été utilisée afin de valider les conditions d'induction.



3. Immunisation d'animaux avec des cellules transfectées

Parallèlement aux expériences visant la production d'une forme soluble du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B, nous avons cherché à produire des cellules transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49B. Dans ce cas, le système immunitaire du rat est stimulé par beaucoup plus d'épitopes sans intérêt pour nous que si la protéine avait été utilisée pour l'immunisation, mais toutefois, contrairement à la situation dans le cas de l'utilisation de cellules LAK, le récepteur Ly49B est exprimé sur toutes les cellules. De plus, l'utilisation de cellules transfectées humaines élimine la compétition antigénique attribuable aux autres récepteurs Ly49 présents sur les cellules LAK.

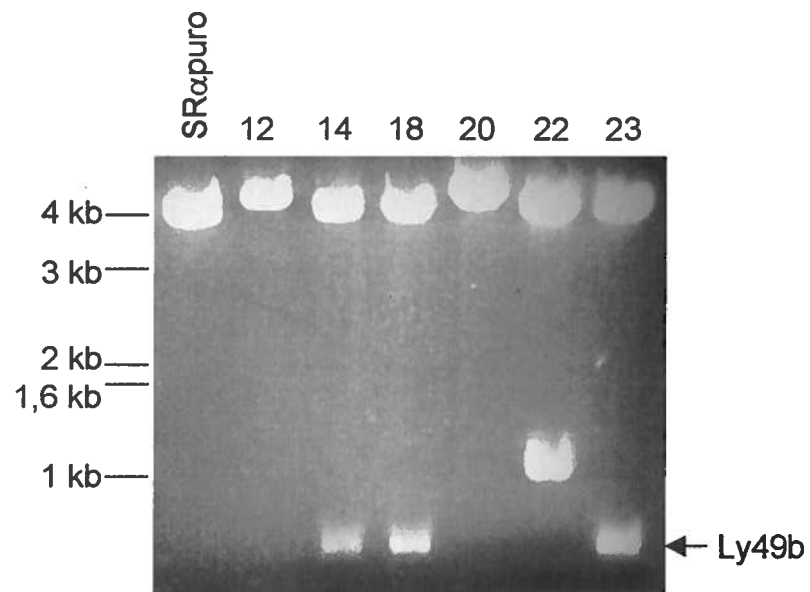
3.1 Clonage dans le vecteur SR α puro

L'amplification par PCR de la région codante du récepteur Ly49B à partir du vecteur pBCMGS-Ly49b a donné un fragment de 881 pb. Le fragment a ensuite été cloné à l'intérieur du vecteur SR α puro comme mentionné à la Section C.3.1. Après la transformation de bactéries compétentes DH11S, l'ADN plasmidique de 24 colonies a été chargé dans un gel d'agarose. L'ADN de 6 colonies qui semblaient contenir un insert a ensuite été analysé par digestion avec l'enzyme de restriction EcoRI afin de vérifier l'orientation de l'insert (Figure 9A). Étant donné que ce site de restriction est présent juste avant l'ADNc du Ly49b dans le vecteur SR α 49b (Annexe 3) et à la position 687 dans l'ADN Ly49b (Wong *et al*; 1991), la présence d'un fragment d'environ 700 pb indique que l'ADNc du Ly49b est dans la bonne orientation. C'est ainsi que 3 vecteurs SR α 49b (14, 18 et 23) ont été identifiés. La séquence du gène Ly49b présent dans l'ADN SR α 49b18 a été confirmée.

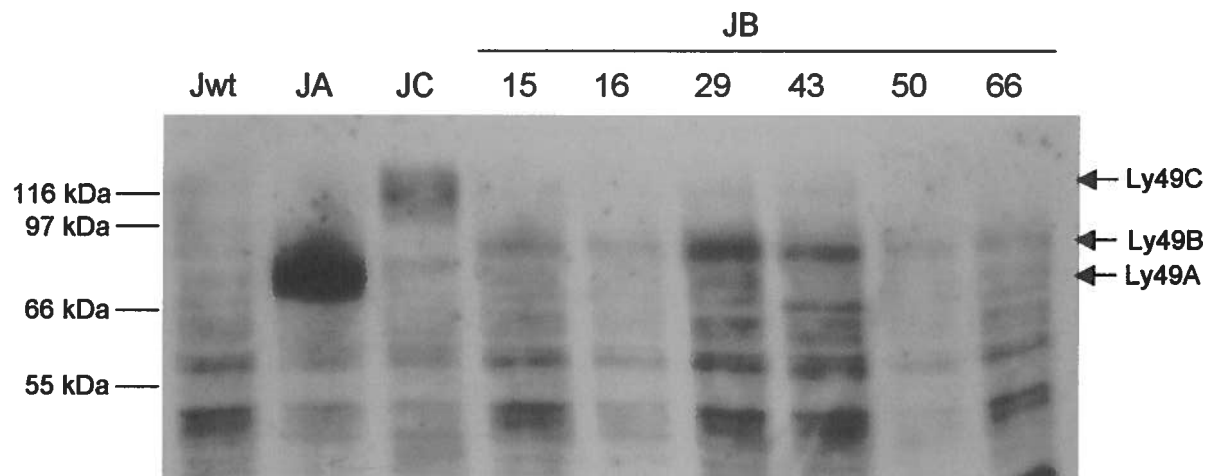
Figure 9 : Production de cellules transfectées avec le récepteur Ly49B

- A) L'ADN plasmidique de 6 colonies DH11S a été analysé par digestion exhaustive avec l'enzyme de restriction EcoRI afin de vérifier l'orientation de l'ADN Ly49b. Le vecteur parental SR α puro a subi le même traitement et sert ici de témoin négatif (gel d'agarose 1%).
- B) Le niveau d'expression du récepteur Ly49B de 6 clones JB a été évalué par SDS-PAGE 10% suivi d'un immunobuvardage de type Western avec les anticorps polyclonaux anti-Ly49A et anti-Ly49C. Des quantités identiques de cellules Jwt, JA et JC ont été ajoutées à l'analyse, respectivement, comme témoins négatif et positifs.

A)



B)



anti-Ly49A et anti-Ly49C

3.2 Transfection de cellules J77.6 et criblage

L'ADN SR α 49b18 a été utilisé pour transfecter les cellules Jwt. Au total, 102 clones ont été obtenus. Ceux-ci ont été criblés à l'aide de sérums polyclonaux anti-Ly49A et anti-Ly49C. Il a été établi que 44 de ces clones expriment le récepteur Ly49B. Des échantillons de 2×10^5 cellules des 6 clones qui semblaient exprimer le plus fortement le récepteur Ly49B ont été chargées dans un gel de polyacrylamide afin de déterminer lequel exprime le mieux le récepteur Ly49B (Figure 9B). Le mélange des anticorps polyclonaux détecte une bande intense à environ 80 kDa avec les cellules transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49A (JA) et une bande à 130 kDa avec les cellules transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49C (JC). Une bande non présente dans les cellules Jurkat parentales (Jwt) est décelée à environ 90 kDa dans les échantillons de cellules transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49B. En comparant l'intensité des bandes correspondant à la protéine Ly49B, nous avons sélectionné les cellules JB29 pour l'immunisation des animaux et pour le criblage.

3.3 Mise au point du test de criblage par cytométrie

Afin de pouvoir détecter tous les anticorps qui reconnaissent le récepteur Ly49B, nous avons mis de côté le test de criblage par ELISA et nous nous sommes inspirés d'une technique de cytométrie en flux utilisée par Smith et ses collaborateurs (2000) pour l'identification de l'AcMo 3D10 (anti-Ly49H). Ce test est basé sur l'analyse par cytométrie en flux d'un mélange de cellules parentales et de cellules transfectées incubées avec un surnageant d'hybridome et un conjugué anti-Ig de rat marqué à la fluorescéine (FITC). Ainsi, les anticorps qui reconnaissent des protéines présentes sur les cellules parentales devraient se lier à toutes les cellules, mais ceux qui reconnaissent la protéine d'intérêt ne devraient se lier qu'aux cellules transfectées.

Afin de déterminer le rapport de cellules à utiliser, différents mélanges de cellules Jwt et de cellules JC ont été analysés par cytométrie en flux en présence de

l'anticorps anti-Ly49C 4LO3311 (Figure 10). Chaque ratio a donné deux populations de cellules bien distinctes. Le ratio 50% Jwt : 50% JC donne le résultat le plus clair. Toutefois, ces résultats confirment que nous pourrions utiliser des ratios différents en cas de disponibilité insuffisante de cellules de l'un ou l'autre type lors du criblage.

3.4 Immunisation et analyse de sérums

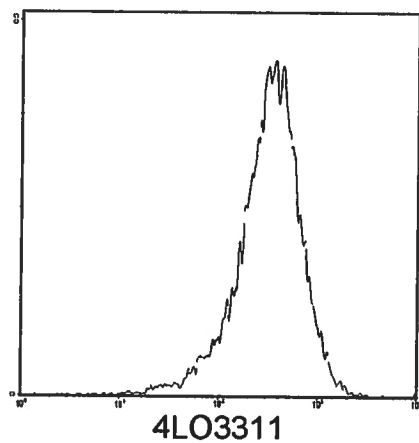
Les animaux A10 à A14 ont été immunisés avec des cellules transfectées JB29 selon les protocoles décrits dans le Tableau 6. Les animaux ont été immunisés en trois groupes soit les rats A10 et A11, A12 et A13 et A14. La réaction des animaux A10 à A13 à l'immunogène a été analysée par cytométrie en incubant les sérums prélevés à différents temps avec un mélange de cellules Jwt et JB29 selon la mise au point effectuée précédemment (Figure 11A). Tous les rats ont réagi à l'immunisation, car leurs sérums contiennent des anticorps qui réagissent avec le mélange de cellules. Il est intéressant de noter qu'on distingue deux populations de cellules avec certains sérums immuns. Ceci est très encourageant car cela laisse croire que les rats A11 à A13 ont reconnu le récepteur Ly49B dans l'immunogène.

Afin d'éliminer la réactivité des sérums avec les cellules Jwt et de confirmer la réactivité spécifique de ceux-ci avec le récepteur Ly49B, les sérums A10-F et A11-2 ont été absorbés avec des cellules Jwt (Figure 11B). C'est seulement après 13 absorptions avec 50×10^6 cellules que la réactivité du sérum A10-F (dilué 1/50) contre les cellules Jwt a été éliminée. Dans le cas du sérum A11-2, 19 absorptions avec 50×10^6 cellules ont été nécessaires pour éliminer cette réactivité à une dilution 1/50. Un fait intéressant est qu'une fois que la réactivité non-spécifique de ces sérums a été éliminée, on peut toujours observer une liaison entre les anticorps de ces sérums et le récepteur Ly49B (Figure 11B). La réactivité du sérum A11-2 absorbé a pu être analysée par rapport à deux autres récepteurs Ly49 puisque nous disposons de cellules transfectées avec les ADNc des récepteurs Ly49A et Ly49C qui sont en quelque sorte les récepteurs

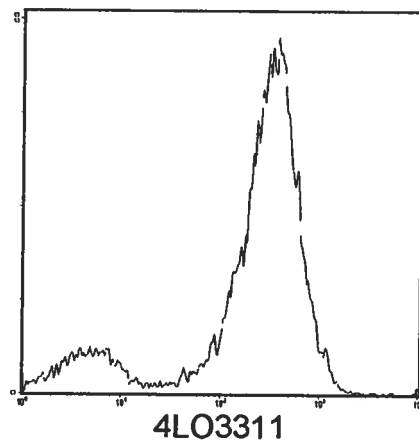
Figure 10 : Mise au point du test de criblage par cytométrie en flux

Des mélanges de cellules Jwt et JC ont été analysés avec l'AcMo 4LO3311 afin de déterminer lequel sera utilisé lors des analyses des surnageants d'hybridomes provenant des fusions A10 à A14. Une suspension de cellules JC seules a été utilisée comme témoin positif.

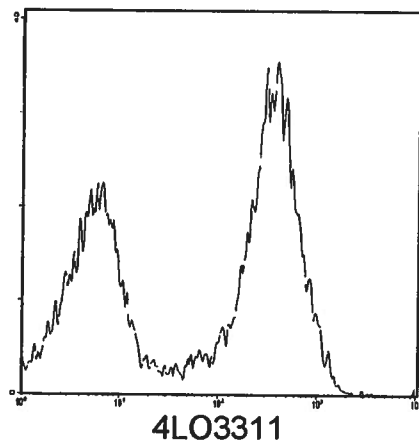
100% JC



25% Jwt : 75% JC



50% Jwt : 50% JC



75% Jwt : 25% JC

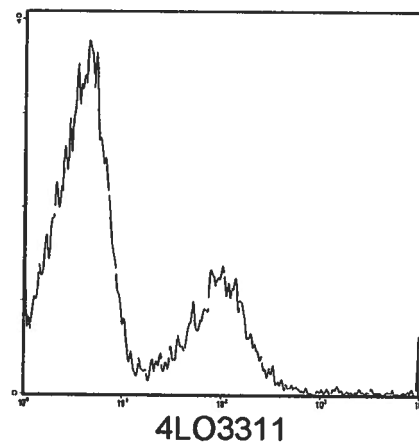
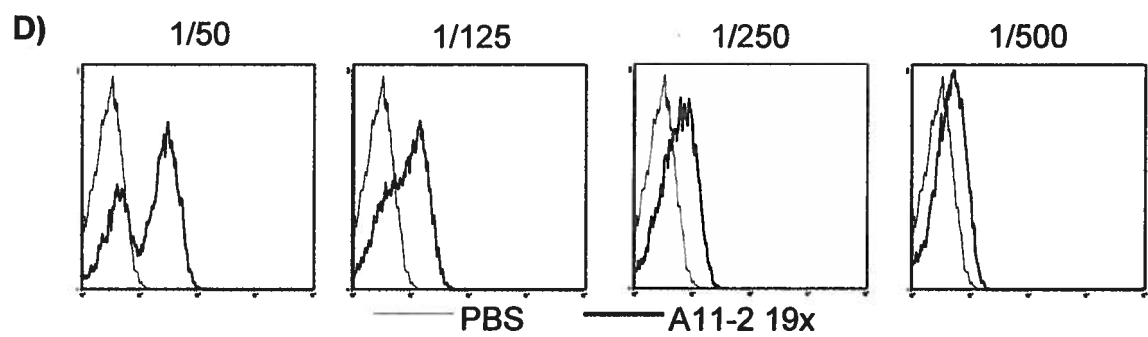
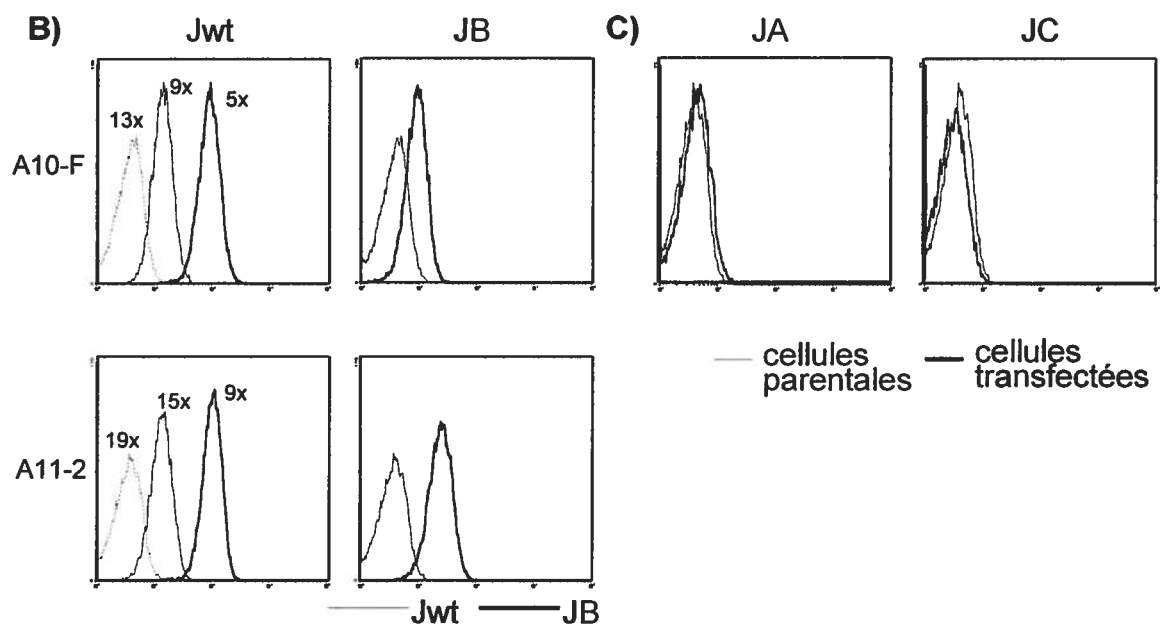
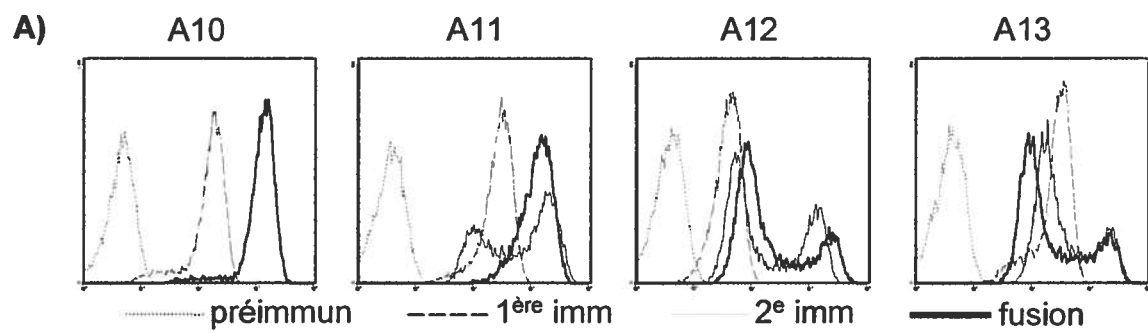


Figure 11 : Analyse des sérums des rats A10 à A13

- A) Des dilutions 1/500 des sérums prélevés après chaque immunisation ont été analysées par cytométrie en flux avec un mélange égal de cellules Jwt et JB29. Les sérums préimmuns à une même dilution ont été utilisés comme témoins négatifs.
- B) Les sérums A10-F et A11-2 ont été absorbés plusieurs fois avec 50×10^6 cellules Jwt. Dans les histogrammes de gauche, l'efficacité des absorptions est illustrée par la diminution progressive du marquage de cellules Jwt une dilution 1/50 des sérums absorbés partiellement et totalement. Dans les histogrammes de droite, le sérum A10-F absorbé 13 fois et le sérum A11-2 absorbé 19 fois ont été utilisés pour marquer les cellules JB29. De ces cas, un marquage de cellules Jwt avec ces sérums a été fait comme témoin négatif.
- C) Pour vérifier la spécificité, des cellules transfectées avec les ADNc des récepteurs Ly49A (JA) et Ly49C (JC) ont été marquées avec une dilution 1/50 du sérum A11-2 absorbé 19 fois. Les cellules de la souche parentale ont été marquées avec le sérum absorbé comme témoin négatif.
- D) Différentes dilutions du sérum A11-2 absorbé 19 fois ont été utilisées pour marquer un mélange égal de cellule Jwt et JB29 afin de valider le test de criblage. Le marquage de ces cellules a été fait avec du PBS comme témoin négatif.



prototypes des groupe Ly49A-like et Ly49C-like (Tableau 1, Figures 3 et 11C) (Chalifour *et al*; manuscrit soumis pour publication, Takei *et al*; 2001). Aucune réactivité contre les récepteurs Ly49A et Ly49C n'a été détectée. De plus, la réactivité de ce sérum avec des cellules NK et LAK de souris C57BL/6, BALB/c et C3H a été évaluée. Malheureusement, chez ces souris aucune différence n'a été observé entre le marquage des cellules avec le sérum préimmun A11-0 ou avec le sérum absorbé A11-2 (1/25) (résultats non-illustrés). Il est donc possible que les anticorps de ce sérum aient une affinité trop faible pour détecter le récepteur Ly49B sur ces cellules ou que celui-ci soit exprimé trop faiblement sur les cellules NK et LAK pour qu'il puisse être détecté par cytométrie en flux. Nous n'avons malheureusement pas pu vérifier la spécificité du sérum par immunobuvardage de type Western puisque l'absorption de celui-ci sur des cellules ne permet pas d'éliminer les anticorps qui ont des épitopes intracellulaires.

Finalement, la pertinence de la technique de criblage d'hybridomes a été confirmée par le marquage d'un mélange égal de cellules Jw1 et JB29 avec le sérum A11-2 absorbé 19 fois (Figure 11D). Les deux populations sont très visibles, mais malheureusement ce sérum ne peut être utilisé à une dilution plus grande que 1/50.

3.5 Fusions et criblage

Tous les rats immunisés avec des cellules transfectées JB29 ont été utilisés pour les fusions. Le bilan des analyses d'hybridomes des 4 premières fusions est rapporté dans le Tableau 10. Chaque fusion a été faite selon le protocole utilisé pour les fusions A9 et A6. Le surnageant de chaque hybridome obtenu a été analysé par cytométrie en flux avec un mélange égal de cellules Jw1 et JB29. La fusion des cellules spléniques du rat A10 a donné peu d'hybridomes, mais 30% de ceux testés sécrétaient des Ig qui se lient à une protéine à la surface des cellules Jurkat visualisé par un histogramme dans lequel 100% de cellules sont positives. Malheureusement, aucun des hybridomes ne sécrétait un anticorps

Tableau 10 : Analyse des hybridomes des fusions A10 à A13

fusion	% puits avec hybridomes	% hybridomes testés	% hybridomes sécréteurs	hybridomes spécifiques
A10	5	93	30	0
A11	56	95	6	0
A12	39	88	8	0
A13	6	85	4	0

spécifique du récepteur Ly49B. Les trois fusions suivantes ont donné un pourcentage d'hybridomes sécréteurs très faible et par conséquent, il n'est pas surprenant qu'aucun de ceux-ci ne sécrétait un anticorps spécifique du récepteur Ly49B.

Étant donné le petit nombre d'hybridomes obtenu, un autre animal a été immunisé (A14), mais cette fois-ci avec une dose plus grande de cellules transfectées. L'hybridome du puits 6G5 provenant de la fusion A14 semble sécréter une Ig spécifique du récepteur Ly49B (Figure 12).

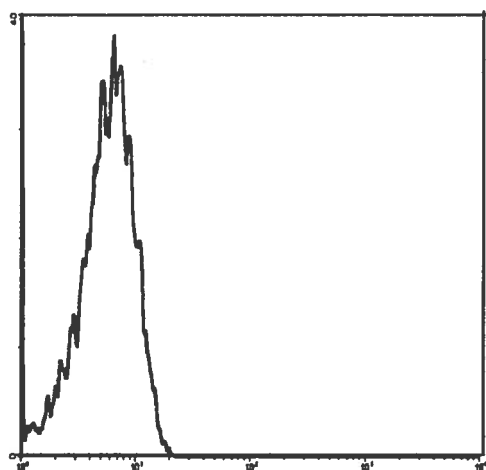
En résumé, suite à l'analyse de près de 450 surnageants d'hybridomes issus de 5 fusions entre des cellules spléniques de rats immunisés avec des cellules JB29 et des cellules myélomateuses P3X63Ag8.653, nous avons enfin obtenu un hybridome qui semble sécréter l'anticorps tant convoité.

Malheureusement, le chemin reste long à parcourir avant de compléter la caractérisation de cet anticorps et de pouvoir l'utiliser pour caractériser le récepteur Ly49B et la période de temps allouée à mon projet de maîtrise est terminée. Il faudra tout d'abord assurer la survie de l'hybridome, faire au moins trois clonages à la dilution limite, procéder à son expansion puis confirmer sa spécificité par analyse comparée de sa réactivité avec les cellules transfectées JA, JB et JC. Il faudra ensuite purifier l'anticorps, déterminer son isotype et tester sa réactivité avec la série de phages recombinants décrits dans ce mémoire. Nous devons également analyser ses propriétés fonctionnelles en évaluant sa capacité à inhiber l'activation via le TCR des cellules JB selon un protocole déjà établi (Chalifour *et al*; manuscrit soumis pour publication). Le plus intéressant sera de rechercher la distribution cellulaire, tissulaire et génétique de ce récepteur intrigant.

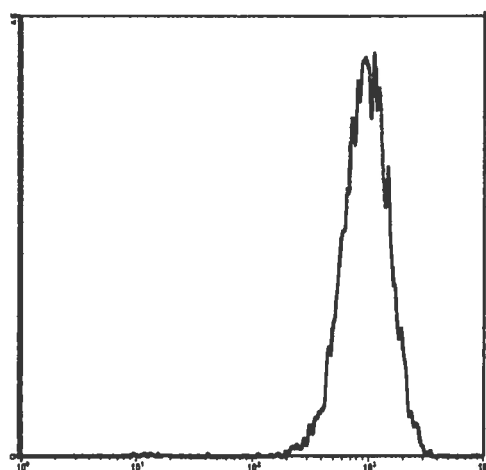
Figure 12 : Obtention d'un surnageant d'hybridome anti-Ly49B

Le surnageant du puits 6G5 contenant un hybridome issu de la fusion A14 réagit avec le récepteur Ly49B lorsqu'il est utilisé pour marquer un mélange égal de cellules Jw et JB29. Comme témoin négatif, un surnageant de cellules P3X63Ag8.653 a été utilisé. Le surnageant de l'hybridome du puits 9B1 issu de la même fusion qui reconnaît une protéine présente sur les cellules parentales a été utilisé comme témoin positif.

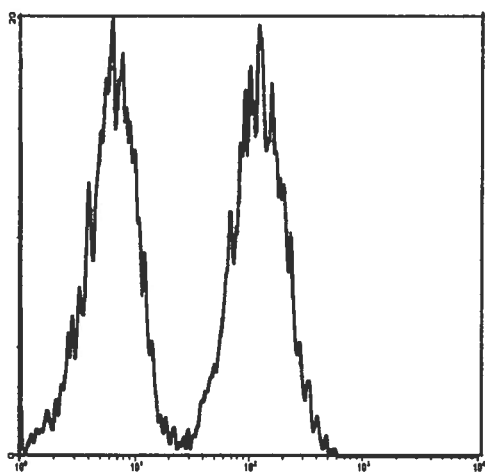
P3X63Ag8.653



9B1



6G5



E. Discussion

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de caractériser le récepteur Ly49B. Ce récepteur été cloné il y a 10 ans, mais son rôle dans l'interaction d'une cellule NK avec sa cible n'est toujours pas connu. Nous croyions que la caractérisation de ce récepteur passait inévitablement par la production d'un AcMo spécifique pour ce récepteur et c'est le premier objectif que nous voulions atteindre. Plusieurs difficultés sont survenues pendant que nous tentions de produire cet anticorps. Tout d'abord, nous avons obtenu de faibles rendements lors des deux premières fusions des cellules spléniques de rats immunisés avec des cellules LAK, puis de faibles rendements lors de la transformation de levures et finalement l'instabilité du domaine extracellulaire soluble du récepteur Ly49B a mené à l'échec de cette deuxième alternative. La persévérance dans la poursuite de l'objectif a été profitable puisqu'un hybridome produisant un anticorps anti-Ly49B a été isolé lors de la cinquième fusion effectuée avec des cellules spléniques de rats immunisés avec des cellules transfectées.

L'utilisation de cellules LAK comme premier immunogène était néanmoins une idée pertinente puisqu'il a été démontré que des cellules NK spléniques de souris C57BL/6 contiennent de l'ARNm du récepteur Ly49B (Kubota *et al*; 1999). Nous avons choisi d'utiliser des cellules LAK de souris CBA/J, car la première séquence de l'ADNc du récepteur Ly49B a été clonée à partir d'une souris de cette souche (Takei *et al*; 1997). De plus, étant donné qu'au début de ce projet l'allèle CBA/J était le seul allèle connu pour le récepteur Ly49B, ce choix s'est donc imposé de lui-même. Avant de procéder aux immunisations d'animaux, nous voulions déterminer le phénotype des cellules NK et LAK de cette souche de souris par rapport aux récepteurs Ly49 contre lesquels des anticorps étaient disponibles (Figure 5). Nous voulions ainsi identifier quels récepteurs Ly49 étaient susceptibles de causer une compétition antigénique au récepteur Ly49B. Nous avons déterminé que 5% de cellules NK et LAK expriment l'épitope reconnu par l'AcMo YE1/32. Toutefois, cet AcMo se lie aux récepteurs Ly49A, Ly49P, Ly49R, Ly49T et Ly49V (Tableau 3). Cependant, cette polyréactivité n'a causé aucun problème lors de l'analyse des cellules NK et LAK de cette souche

de souris, car, de ceux-ci, seulement le récepteur Ly49A semble être exprimé chez la souris CBA/J (Tableau 2). Il est néanmoins possible que les allèles CBA/J des récepteurs nouvellement clonés Ly49R, Ly49T et Ly49V soient trouvés lors d'études ultérieures. Pour l'instant, nous pouvons affirmer que l'AcMo YE1/32 n'a identifié que 5% des cellules NK et LAK de cette souche de souris et qu'il s'agissait vraisemblablement des cellules qui expriment le récepteur Ly49A. La taille de cette population chez la souris CBA/J est donc 4 fois plus petite que celle de la souris C57BL/6 (Brennan *et al*; 1994).

Nous voulions ensuite vérifier l'expression du récepteur Ly49G2. Il a toutefois été impossible d'utiliser l'AcMo 4LO439 produit dans notre laboratoire, car cet anticorps ne reconnaît que l'allèle C57BL/6 du récepteur (Tableau 3). Nous avons donc utilisé l'AcMo 4D11 qui au moment de l'étude était connu pour se lier aux récepteurs Ly49A et Ly49G2 qui sont tous deux présents chez la souris CBA/J (Tableaux 2 et 3). Toutefois, depuis le clonage du récepteur Ly49L, il a été déterminé que cet AcMo a, non pas une double, mais une triple réactivité chez cette souris (Makrigiannis *et al*; 2000, Tableau 3). Les résultats de cytométrie avec l'AcMo 4D11 étaient donc complexes à analyser (Figure 5). Étant donné qu'aucun anticorps anti-Ly49 ne reconnaissait spécifiquement les récepteurs Ly49G2 et Ly49L chez cette souche de souris (Tableau 3), il était donc impossible de déterminer la proportion des cellules qui expriment ou coexpriment ces récepteurs. C'est seulement lorsque de tels anticorps seront disponibles qu'il sera possible de clarifier le phénotypage des cellules NK et LAK de cette souche de souris par rapport aux récepteurs Ly49G2 et Ly49L.

Finalement, le profil d'expression des récepteurs Ly49C et Ly49I chez la souris CBA/J a été analysé avec deux AcMo produits dans notre laboratoire : le 4LO3311 (Ly49C) et le 5GA5 (Ly49C/I) (Tableau 3). Ces deux AcMo ont reconnu environ 52% des cellules NK et LAK de cette souche de souris (Figure 5). Ceci nous laissait croire que l'allèle du récepteur Ly49I reconnu par le 5GA5 chez la souris C57BL/6 n'est pas exprimé par les cellules de cette souche de souris.

Nous avons confirmé ce résultat en effectuant un double marquage sur les cellules NK et LAK de souris CBA/J avec ces 2 anticorps. Aucune cellule n'a été marquée par seulement un des deux anticorps et la distribution des cellules sur une étroite ligne oblique suggérait que les deux anticorps avaient reconnu la même molécule soit Ly49C (résultats non-illustrés). Cette observation que plus de 50% des cellules NK de CBA/J expriment le récepteur Ly49C a été surprenante, car selon une étude précédente effectuée avec l'AcMo SW5E6 (Ly49C/I) ce récepteur ne serait exprimé que sur 13% des cellules NK spléniques chez cette souche de souris (Ortaldo *et al*; 1999). Ce pourcentage était toutefois douteux car deux populations distinctes de cellules n'étaient pas visibles dans l'histogramme montré dans cette publication. Les marquages que nous avons effectués avec l'AcMo SW5E6 sur des cellules NK nous ont d'abord permis d'obtenir des résultats identiques à ceux publiés (résultats non-illustrés). Toutefois, lorsque nous avons augmenté la concentration de l'AcMo de 8 fois, plus de 46% des cellules NK ont été marquées (résultats non-illustrés). Ces résultats suggèrent que l'AcMo 5GA5 a une meilleure affinité que SW5E6 pour le récepteur Ly49C. Les variations dans les fréquences de cellules Ly49A⁺ et Ly49C⁺ chez les deux souches de souris nous permettent d'espérer que les cellules exprimant Ly49B chez CBA/J pourraient être plus nombreuses que chez la souris C57BL/6.

Ce phénotypage des cellules NK/LAK de la souche de souris CBA/J a non seulement permis d'évaluer sommairement la nature de la compétition antigénique offerte au récepteur Ly49B par certains autres récepteurs Ly49, il a aussi permis d'établir des paramètres pour vérifier la qualité des enrichissements. Ainsi, seulement les enrichissements ayant produits une suspension cellulaire qui contenait de 45 à 50% de cellules Ly49C⁺ ont été utilisés pour les immunisations.

La complexité de l'immunogène a rendu essentiel le développement d'un test sélectif des surnageants d'hybridomes pour pouvoir discriminer les anticorps qui

reconnaissent le récepteur Ly49B de ceux que se lient aux autres récepteurs Ly49. Nous avons pris avantage de la grande différence de la séquence protéique du récepteur Ly49B par rapport à celle des autres récepteurs Ly49 pour choisir 7 épitopes potentiels pour un AcMo spécifique de ce récepteur (Figure 3 et Tableau 7). Ces épitopes ont été exprimés à la surface des phages filamenteux fUSE5 qui sont utilisés dans le test de criblage par ELISA. Un des désavantages de cette approche était que seulement les anticorps reconnaissant des épitopes linéaires pouvaient être détectés. Suite à la publication de la structure cristallographique du récepteur Ly49A lié à son ligand H-2D^d, nous avons pu estimer la position, dans la représentation 3D de la protéine, des séquences Ly49B choisies (Torma *et al*; 1999). Certaines des séquences semblaient situées dans des boucles exposées du récepteur (résultats non-illustrés), nous croyions donc qu'il était possible que ces séquences induisent la production d'un anticorps dirigé contre un épitope linéaire.

La mise au point du test ELISA a permis d'établir qu'une Ig spécifique présente dans un surnageant de culture à une concentration d'au moins 100 ng/ml pouvait être détectée (Figure 6A). Donc, le test était très sensible, car en théorie lors d'une production de surnageant d'hybridome, une concentration de 1 à 10 µg/ml d'Ig peut être obtenue selon la qualité de l'hybridome (CPI, Section 2.6.8). Le test était de plus très efficace, car il permettait d'analyser la spécificité de chaque hybridome contre un mélange de jusqu'à 8 phages simultanément (Figure 6B). Finalement, étant donné que seulement 70 à 100 µl de surnageant étaient nécessaires pour chaque test, il était possible de tester simultanément chaque hybridome contre 2 mélanges de phages. La suspension immunogène utilisée étant très hétérogène, cela permettait de tester les surnageants de chacun des hybridomes contre plusieurs phages qui exprimaient des séquences uniques de différents récepteurs Ly49. Par conséquent, il était possible de tirer le maximum d'hybridomes intéressants de chaque fusion effectuée.

Afin de pouvoir choisir les animaux à utiliser pour chaque fusion le sérum de ceux-ci a été analysé selon trois critères. D'abord, nous avons recherché la présence d'anticorps réagissant avec les cellules LAK dans les sérums immuns des animaux (résultats non-illustrés). Tous les animaux ayant produit de tels anticorps, il était donc possible que chacun de ces rats ait reconnu le récepteur Ly49B. Nous avons remarqué que le sérum des animaux immunisés plusieurs fois réagissait plus fortement avec les cellules LAK. Les animaux immunisés ayant reçu plusieurs injections de rappel, ils ont évidemment eu plus d'occasions d'entrer en contact avec chacune des protéines de surface que les animaux qui ont été immunisés une seule fois. Ces derniers n'ont peut-être pas réagi à la première immunisation contre certaines protéines peu exprimées. Cette observation est importante car étant donné que le récepteur Ly49B semblerait peu exprimé sur les cellules LAK, plusieurs immunisations des animaux étaient donc justifiées. Ensuite, les sérums des animaux prélevés après chaque immunisation ont été analysés en ELISA (Figure 7A). Seuls les sérums de quelques rats montrent une réactivité avec les phages. Ces sérums positifs se liaient malheureusement à tous les phages lorsque ceux-ci ont été testés de façon individuelle et ce même lorsqu'un phage exprimant une séquence de 8 résidus valine a été utilisé (résultats non-illustrés). Or, cette séquence n'est pas présente dans les protéines de souris et de rats. Il est donc probable que ces sérums reconnaissent une ou des protéine(s) phagique(s) qui aurait(ent) un épitope commun avec une ou des protéine(s) exprimée(s) sur des cellules LAK. Il est aussi possible que les animaux aient rencontré des bactéries infectées par des phages avant que nous commencions à les immuniser. Cependant, comme aucun sérum préimmun ne réagissait avec le mélange de phages cette hypothèse a peu de chances d'être exacte. Finalement, afin de déterminer si les récepteurs Ly49 étaient immunogènes dans le protocole d'immunisation utilisé, nous avons marqué parallèlement des cellules Jurkat T humaines parentales ou transfectées avec les ADNc des récepteurs Ly49A (JA) et Ly49C (JC) avec les sérums immuns (Figure 7B). À notre surprise, 5 des 6 sérums analysés réagissaient aussi avec les cellules Jurkat parentales ce qui masquait la

réactivité éventuelle avec les récepteurs transfectés. Cette réactivité avec des cellules Jurkat parentales est sans doute due à l'homologie de protéines humaines et murines communes aux cellules LAK de souris et aux cellules Jurkat T humaines. Par exemple, la séquence du CD2 murin est identique à 54% à celle du CD2 humain (Sewell *et al*; 1987), ce qui pourrait être la cause de cette réactivité croisée. Une observation intéressante est que même si ces sérums se liaient aux cellules parentales, lorsque les cellules transfectées avec le récepteur Ly49C ont été marquées avec les sérums, l'histogramme obtenu avait le même profil que lorsque ces cellules étaient marquées avec l'AcMo 4LO3311 (Figure 7B, résultats non-illustrés). Les 2 pics obtenus étaient dus à la présence de deux clones qui exprimaient un niveau différent de récepteur Ly49C dans la population de cellules utilisées. Comme les sérums donnaient le même profil, nous pouvions croire que ceux-ci contenaient des Ig spécifiques du récepteur Ly49C. Un autre fait intéressant est que le sérum du rat A9 prélevé après la deuxième immunisation ne réagissait pas avec les cellules Jurkat de type parental. Pourtant, il réagissait faiblement avec les cellules transfectées avec le récepteur Ly49A et plus fortement avec celles transfectées avec le récepteur Ly49C. Cette différence dans la réactivité des sérums par rapport aux deux récepteurs semble proportionnelle aux tailles des sous-populations de cellules LAK de souris CBA/J qui les expriment (Figure 5). Cette dernière observation nous indique que notre protocole d'immunisation permet la reconnaissance des récepteurs Ly49 sur des cellules LAK par le système immunitaire du rat et ce même s'ils sont exprimés sur une faible proportion de cellules.

Ces analyses de sérums nous ont permis de choisir 4 animaux pour les fusions. Lors des 2 premières fusions le pourcentage de puits contenant des hybridomes qui atteignaient une confluence assez grande pour permettre le clonage était assez faible (Tableau 8). Ceci suggère que le partenaire de fusion n'était pas efficace. Selon les recommandations du CPI, il est important d'avoir un partenaire de fusion dont nous connaissons l'historique. Ceci n'était pas le cas pour les deux premiers partenaires des fusions utilisés. Ce n'est qu'avec le

troisième partenaire de fusion que les rendements de fusions ont atteint les valeurs auxquelles on pouvait s'attendre. En effet, selon CPI, plus de 50% des puits ensemencés devraient contenir des hybridomes. De ceux-ci, 30 à 50% devraient sécréter des Ig spécifiques des épitopes extracellulaires des cellules si un tel immunogène a été utilisé. Dès lors, le fait d'avoir obtenu 75% d'hybridomes sécréteurs lors de la fusion A6 peut paraître surprenant, mais étant donné que nous détectons par ELISA toutes les Ig sécrétées, c'est-à-dire même celles qui reconnaissent des épitopes intracellulaires, il était possible d'obtenir un tel rendement.

Malgré l'analyse de 1550 surnageants d'hybridomes lors de ces fusions, il n'a pas été possible de détecter un hybridome qui sécrétait une Ig spécifique des séquences du récepteur Ly49B insérées dans les phages recombinants, même si, afin d'améliorer nos chances de succès, la souche des rats immunisés et la voie d'innoculation ont varié au cours des immunisations. Les protocoles classiques de production d'AcMo de rat utilisent des rats Fisher F344. C'est précisément ce que nous avons fait, mais nous avons aussi utilisé des rats de souche DA, car il semble qu'aucun récepteur Ly49 ne soit présent chez ces animaux (Dissen *et al*; 1996). Dans notre cas, cette dernière observation aurait pu être avantageuse car lors des immunisations de ces animaux avec des cellules murines l'absence totale d'homologie au niveau des séquences cibles aurait pu accroître l'efficacité du criblage. Malheureusement, bien qu'ils aient produit une réponse contre les cellules LAK, aucune réactivité anti-phage n'a pu être observée dans leurs sérums (Figure 7A)

En dépit de tous nos efforts, il a été impossible d'isoler l'hybridome voulu dans le cadre des fusions effectuées avec des cellules spléniques de rats immunisés avec des cellules LAK. Cet échec est probablement dû à la faible proportion de cellules qui expriment le récepteur Ly49B (Kubota *et al*; 1999, Takei *et al*; 2001). Ce facteur ajouté à la grande compétition antigénique attribuable aux autres protéines de surfaces ne jouait certainement pas en notre faveur. Pour

compenser ce faible niveau d'expression, nous aurions probablement dû analyser plusieurs milliers de surnageants. Néanmoins, ceci n'aurait peut-être même pas porté fruit, car, étant donné qu'aucun AcMo ne se lie au récepteur Ly49B, l'expression de ce récepteur sur les cellules LAK de souris CBA/J n'a jamais été démontrée. Pour l'instant, seule une étude de RT-PCR a montré la présence d'ARNm de ce récepteur dans un groupe de 1000 cellules NK de souris C57BL/6 (Kubota *et al*; 1999).

Afin de disposer d'un meilleur immunogène, nous avons songé à immuniser des animaux avec le domaine extracellulaire du récepteur Ly49B soluble. Nous avons choisi de cloner seulement le domaine extracellulaire du récepteur, car c'est contre cette région que nous voulions des anticorps. De plus, en éliminant le domaine transmembranaire, cette région hydrophobe ne pouvait plus causer de problème lors de la sécrétion de la protéine à l'extérieur des levures. Le système d'expression dans les levures *Pichia pastoris* était un système de choix pour exprimer le récepteur Ly49B, car, contrairement au récepteur Ly49C qui contient 5 sites potentiels de N-glycosylation, le récepteur Ly49B n'en contient que 2. Un grand nombre de sites de N-glycosylation pourrait entraîner une modification de la structure de la protéine, car ce type de levure a tendance à ajouter une chaîne latérale de 8 à 14 résidus mannose dans la structure du sucre (Grinna & Tschopp; 1989). Toutefois, malgré cet inconvénient la levure *Pichia pastoris* était plus avantageuse que la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui elle peut ajouter entre 50 et 150 de ces résidus mannose (Grinna & Tschopp; 1989). Le domaine extracellulaire du récepteur Ly49D ayant déjà été produit dans des cellules d'insectes, nous avons confiance qu'il était possible de produire une telle protéine tronquée (Coles *et al*; 2000).

L'utilisation de levures était plus profitable que l'utilisation d'un système d'expression bactérien puisque les modifications post-traductionnelles des protéines de levure sont très semblables à celles effectuées par des cellules eucaryotes plus avancées. Ainsi, nous pouvions penser qu'une protéine de

souris produite chez les levures aurait une structure plus conforme à la réalité que si elle avait été produite chez les bactéries. Étant donné que la protéine serait, dans notre cas, utilisée pour immuniser un animal et pour induire la production d'anticorps, il était important qu'elle ait une structure similaire à celle du récepteur murin si nous voulions que les AcMo produits reconnaissent la protéine sur des cellules de souris. Finalement, ce système était beaucoup moins coûteux qu'un système d'expression qui utilise des cellules d'insectes ou de mammifères et moins fastidieux à utiliser car les levures se manipulent comme des bactéries.

Malgré tous les bons côtés de ce système d'expression, plusieurs transformations de levures compétentes ont été nécessaires pour parvenir à finalement analyser la sécrétion de protéines de seulement 90 transformants (Tableau 9). Aucun de ceux-ci ne sécrétait une protéine stable qui aurait pu correspondre au domaine extracellulaire du Ly49B. D'abord, les 53 premiers transformants analysés, ceux obtenus lors de la transformation 4, n'étaient probablement pas de bons transformants car nous avons diminué d'un facteur 10 la concentration de la zéocine. Les colonies obtenues pouvaient donc être des levures qui n'avaient pas intégré le plasmide dans leur génome ou que celui-ci ait été intégré à la mauvaise position. Ensuite, seulement 37 transformants pZ α 49b ont été obtenus dans les bonnes conditions de sélection. Ce rendement est très faible, car, selon Invitrogen, le protocole de transformation utilisé aurait dû donner plusieurs centaines à plusieurs milliers de colonies résistantes à la zéocine. Il est possible que nos faibles rendements aient été causés par une mauvaise préparation des cellules compétentes et ce, même si elles ont été préparées plusieurs fois selon le protocole recommandé. En effet, étant donné que le pH des solutions utilisées n'était pas indiqué dans le manuel d'instruction, il est possible qu'un facteur hors de notre contrôle, par exemple l'eau, change le pH optimum des solutions et ainsi fragilise les cellules. Il aurait peut-être fallu utiliser une autre source d'eau, par exemple, de l'eau déionisée ou en bouteille pour faire les solutions et ainsi écarter cette possibilité. Une fragilité de la

membrane externe des levures peut être critique pour la sélection de transformants, car ceci augmente la sensibilité à la zéocine et les transformants meurent avant même de pouvoir exprimer le gène de résistance. D'autres paramètres qui ont pu nuire à l'efficacité de la transformation sont la qualité de l'ADN et la réaction d'électroporation elle-même. Après réflexion, il se peut que la qualité de l'ADN ait été la source de nos échecs. En effet, le vecteur commercial a été utilisé pour la troisième transformation, cependant lors de ce test, nous ne savions toujours pas qu'il fallait attendre de 7 à 10 jours pour obtenir des transformants résistants à la zéocine. Étant donné que plusieurs préparations d'ADN différentes ont quand même été utilisées, il est peu probable que ceci soit la cause de nos faibles rendements. Finalement, je doute que le problème d'efficacité des transformations provenait de la réaction d'électroporation. En effet, les paramètres utilisés correspondaient à ceux suggérés par le fabricant de l'électroporateur pour transformer des levures. De plus, la durée de la décharge électrique lors des transformations était à chaque fois conforme aux attentes (entre 4,5 - 5,0 msec).

Malgré le peu de transformants analysés, nous avons vu, suite à une coloration au bleu de Coomassie, une protéine d'environ 60 kDa dans le surnageant d'induction du clone 17 de la transformation 10 (Figure 8). Cette protéine ayant la taille attendue d'un homodimère du domaine extracellulaire du récepteur Ly49B en conditions non-réductrices, nous avons essayé de l'identifier. Toutefois, malgré plusieurs tentatives, nous n'y sommes pas arrivés car nous ne l'avons plus observée. Il est possible que la protéine tronquée ait été instable dans le surnageant d'induction des levures. La présence de multiples bandes sur le gel coloré au nitrate d'argent semblerait supporter cette hypothèse (résultat non-illustré). Il est à noter que ce milieu est très différent du milieu de culture de cellules d'insectes. Ceci pourrait expliquer pourquoi le domaine extracellulaire du récepteur Ly49D avait pu être produit (Coles *et al.*; 2000). De plus, on ne peut passer sous silence la faible homologie de la séquence du récepteur Ly49B par rapport aux autres récepteurs de la famille Ly49. Cette particularité a peut-être

joué contre nous, car il est possible que le domaine extracellulaire du récepteur Ly49B n'était pas aussi stable que celui du Ly49D même s'ils avaient été tous deux produits dans les mêmes conditions. Toutefois, ceci serait surprenant car la séquence du Ly49B contient 10 des 11 cystéines présentes dans la portion extracellulaire de la quasi-totalité des autres récepteurs Ly49 murins (Figure 3).

En résumé, afin d'obtenir un clone de levure qui sécrète assez de Ly49B tronqué, il aurait probablement fallu analyser une grande quantité de clones. Pour y parvenir, plusieurs autres étapes de mise au point de la transformation auraient été nécessaires. Nous demeurons convaincus que l'utilisation d'un tel immunogène aurait été idéale, car en concert avec le criblage par banque de phage, les chances d'obtenir un anticorps monoclonal contre un épitope déterminé aurait été très grandes. Malheureusement, plusieurs expériences restent à faire afin d'adapter cette technique à nos besoins. Nous aurions aussi pu tenter de produire la protéine tronquée dans un système bactérien, malgré les limites de ce système énoncées précédemment. Cette alternative n'a toutefois pas été explorée principalement à cause des résultats intéressants obtenus avec l'immunisation d'animaux avec des cellules transfectées.

L'immunisation avec des cellules transfectées avec le récepteur Ly49B nous semblait être un bon compromis entre l'immunisation avec des cellules LAK et avec la protéine tronquée. Nous avons choisi de transfecter des cellules Jurkat, plutôt que des cellules COS-7, puisque ces clones pourraient être utilisés pour le criblage des hybridomes et ensuite pour l'analyse fonctionnelle du récepteur Ly49B selon la technique mise au point dans notre laboratoire par Chalifour et collaborateurs (manuscrit soumis pour publication). Au début, nous avons commencé la production de cellules transfectées parce qu'elles étaient nécessaires pour vérifier la spécificité d'un anticorps anti-Ly49B produit suite à l'immunisation d'animaux avec le domaine extracellulaire du récepteur. Nous avons l'intention de cribler les transfectants avec un sérum immun des animaux auxquels nous aurions administré la protéine. Étant donné qu'un tel sérum n'était

pas disponible puisque nous ne sommes pas parvenus à produire la protéine tronquée, nous avons dû changer la technique de criblage des transfectants. Ceux-ci ont donc été criblés à l'aide d'un mélange égal d'anticorps polyclonaux dirigés respectivement contre la partie intracellulaire des récepteurs Ly49A et Ly49C. Il était possible qu'au moins un de ces deux anticorps reconnaisse aussi le Ly49B, car la partie intracellulaire de ce récepteur a une identité de 68% et de 70% à celles des récepteurs Ly49A et Ly49C, respectivement. De plus, étant donné que Smith et collaborateur (2000) ont déjà utilisé un sérum polyclonal dirigé contre les 40 premiers acides aminés du récepteur Ly49A pour détecter des transfectants Ly49B, nous étions confiants que cette technique de criblage fonctionnerait aussi dans nos conditions. Nous avons utilisé un mélange des deux anticorps, car, selon notre mise au point, l'anticorps polyclonal anti-Ly49A ne reconnaissait pas le récepteur Ly49C et vice-versa (résultats non-illustrés). Étant donné que ces deux réactifs contiennent des anticorps de spécificités différentes, nous avons mis toutes les chances de notre côté pour détecter le récepteur Ly49B dans les transfectants en utilisant un mélange.

Au total, 44 clones sur 102 exprimaient le récepteur Ly49B. Il est néanmoins possible que d'autres clones l'exprimaient aussi, mais à un niveau plus faible qui n'aurait pas pu être déterminé par immunobuvardage de type Western avec ces sérums étant donné l'intensité assez forte du bruit de fond. L'analyse de l'expression du récepteur Ly49B par immunobuvardage de type Western de la Figure 9 n'était que qualitative, mais elle a tout de même permis de déterminer que le clone JB29 exprimait le mieux le récepteur Ly49B. Selon les résultats illustrés dans la Figure 9, il est possible d'estimer la taille du récepteur Ly49B à environ 90 kDa en conditions non-réductrices. Ceci est légèrement supérieur à la taille de 75 kDa du récepteur Ly49B évaluée par Smith et collaborateur (2000). Dans cette publication, la taille de la protéine Ly49B a été déterminée à partir de cellules transfectées C1498, une souche de cellules murines. Il est possible que certaines modifications post-traductionnelles soient différentes de celles faites

par les cellules Jurkat T humaines ce qui pourrait expliquer la différence dans la taille de la protéine observée dans notre étude.

Le test de criblage des hybridomes par ELISA était très spécifique. Toutefois, avec cette technique de criblage, il est possible de perdre certains AcMo qui seraient spécifiques du récepteur Ly49B, mais dont les épitopes n'ont pas été insérés dans un phage. Comme nous disposions maintenant de cellules transfectées, la technique d'analyse d'hybridomes utilisée par Smith et collaborateur (2000) nous semblait la méthode de choix pour le criblage des prochaines fusions. Cette technique était beaucoup plus efficace que celle des phages, car tous les anticorps qui se liaient au récepteur Ly49B pouvaient être identifiés et ce même si ceux-ci reconnaissaient des épitopes conformationnels. De plus, en mélangeant les deux types de cellules nous n'avions à effectuer qu'une lecture au cytofluoromètre par surnageant d'hybridome testé. Ceci permettait de déterminer si l'hybridome sécrétait des Ig et si celles-ci se liaient ou non au récepteur Ly49B. Cette technique était aussi plus rapide, puisque le résultat de chaque criblage était connu la journée même du test contrairement au test ELISA qui se faisait sur deux jours. Par ailleurs, contrairement au test ELISA, les AcMo identifiés par cytométrie en flux pouvaient ne pas être spécifiques au récepteur Ly49B et reconnaître également un ou plusieurs autre(s) récepteur(s) Ly49. Toutefois, étant donné qu'aucun des AcMo anti-Ly49 présentement connus ne se lie à ce récepteur, même un anticorps qui reconnaîtrait un épitope présent sur plus d'un récepteur serait intéressant car il pourrait être utilisé pour vérifier, entre autres, la fonction inhibitrice du récepteur avec des cellules transfectées. Une autre limite de cette technique de criblage était que, dans les conditions actuelles, seulement des anticorps qui se liaient au récepteur d'intérêt pouvaient être détectés. Il était cependant mieux de chercher des anticorps contre un seul récepteur avec une technique moins sélective que de vouloir obtenir des anticorps contre plusieurs récepteurs avec une méthode très restrictive.

Les animaux A10 à A14 ont donc été immunisés avec différentes doses de cellules JB29 (Tableau 6). Les sérums prélevés après chaque immunisation des animaux A10 à A13 ont été analysés par cytométrie en flux selon la mise au point qui avait été effectuée (Figure 11A). Il a été intéressant de noter que déjà à une dilution 1/500 des anticorps spécifiques du récepteur Ly49B étaient détectables dans le sérum. De plus, une réactivité contre le récepteur Ly49B a été identifiée suite à une absorption du sérum avec des cellules parentales et ce même si cette réactivité n'était pas décelable avec le sérum brut (Figure 11B, sérum A10-F). Dans le cas d'un sérum dont la réactivité avec le récepteur Ly49B était détectable avant les absorptions, celle-ci a été confirmée suite aux absorptions (Figure 11B, sérum A11-2). Le sérum A11-2/19x réagissait assez fortement avec le récepteur Ly49B et ne semblait pas se lier aux récepteurs Ly49A et Ly49C. Au départ, cette observation nous a surpris, car même si le récepteur Ly49B ne présente en moyenne que 48% d'identité avec les autres récepteurs Ly49, il possède plusieurs acides aminés et séquence consensus à ces récepteurs (Figure 3). Nous croyons donc que la spécificité de ce sérum est due au fait que les séquences uniques du récepteur Ly49B sont plus immunogènes que les autres régions du récepteur. Ceci est probablement dû au fait que les séquences qui sont consensus parmi les récepteurs murins sont la plupart du temps présentes aussi chez le rat (Figure 3). Il est, par ailleurs, possible que des Ig qui reconnaîtraient les autres récepteurs Ly49 étaient présentes dans le sérum, mais qu'elles étaient en trop faible quantité pour marquer efficacement les cellules exprimant ces récepteurs.

Encouragés par l'analyse de spécificité du sérum A11-2/19x, nous avons tenté de détecter avec ce sérum absorbé le récepteur Ly49B sur des cellules NK et LAK spléniques de souris C57BL/6, BALB/c et C3H (résultats non-illustrés). Malheureusement, aucune cellule n'a été marquée. Il est possible que les anticorps présents dans ce sérum avaient une affinité trop faible pour détecter le récepteur Ly49B sur ces cellules ou encore que ce récepteur soit trop faiblement exprimé à leur surface. Ces résultats étaient toutefois encourageants car si le

sérum avait reconnu assez fortement un autre récepteur exprimé chez une ou l'autre des souches de souris analysées, nous l'aurions vu en cytométrie. Nous pouvions donc penser que le sérum A11-2 /19x se liait au récepteur Ly49B et qu'il ne se liait pas fortement à aucun autre récepteur Ly49 présent en assez grande quantité chez les souches de souris analysées. Il aurait été intéressant d'analyser l'expression du récepteur Ly49B sur des cellules NK et LAK de souris CBA/J. Malheureusement, nous ne disposons pas à ce moment de souris de cette souche. Toutefois, puisque l'allèle CBA/J de Ly49B est le même que l'allèle BALB/c, nous croyons que si une réactivité de ce sérum avec des cellules NK et LAK avait pu être détectée, nous l'aurions vue chez ces souris.

Tous les animaux immunisés avec des cellules transfectées JB29 ont été utilisés pour des fusions (Tableau 10). Les rendements obtenus lors des 4 premières fusions étaient très inférieurs à nos attentes. Ceci était vraisemblablement dû à la fragilité des cellules myélomateuses P3X63Ag8.653, car au moment de chaque fusion plusieurs cellules ne survivaient pas aux lavages. Les rendements obtenus lors de la fusion des cellules spléniques du rat A14, qui avait été immunisé avec une plus forte dose de cellules, n'étaient pas meilleurs, mais cette fusion a permis d'analyser un peu plus d'hybridomes et ainsi d'augmenter nos chances de réussite. C'est ainsi que nous avons réussi à identifier un hybridome qui semblait sécréter un anticorps contre le récepteur Ly49B (Figure 12). En effet, le surnageant du puits 6G5 ne reconnaissait que 50% des cellules marquées, donc seulement celles qui étaient transfectées avec le récepteur Ly49B. Ce résultat a été confirmé plusieurs fois. En outre, la capacité sécrétrice de l'hybridome et sa spécificité ont parfaitement été conservées après un deuxième clonage à dilution limite.

Il faut maintenant nous assurer, avant toute caractérisation, que cet anticorps ne reconnaît que le récepteur Ly49B. Un tel outil sera très utile pour déterminer la fonction du récepteur Ly49B. De plus, comme ce récepteur fait bande à part, il est possible que cet anticorps nous permette d'identifier un rôle différent pour le

récepteur Ly49B par rapport aux autres membres de la famille. De ce fait, cet anticorps pourrait permettre de révéler un aspect inconnu des cellules NK.

Malgré que le temps ne m'ait pas permis d'achever la caractérisation de l'hybridome sélectionné, ce projet de maîtrise a mené à l'exploration de différentes avenues pour la production d'un AcMo. La méthode de criblage par phage demeure une approche valable pour la production d'un anticorps ayant un épitope spécifique. Cependant, nous savons maintenant qu'il faut analyser un très grand nombre d'hybridomes afin d'obtenir celui désiré. L'utilisation de cellules transfectées comme immunogène et comme outil de criblage nous donne, quant à elle, de meilleures chances d'obtenir plus rapidement un anticorps contre la protéine ciblée sans toutefois nous assurer que l'anticorps obtenu ne reconnaîtra pas un épitope commun à d'autres protéines homologues. Considérant les observations effectuées dans le contexte de ce projet de maîtrise, le chemin à parcourir entre la décision de produire un AcMo contre une protéine appartenant à une famille dont les membres ont un haut niveau d'homologie (que la spécificité recherchée soit ou non contre un épitope sélectionné d'avance) et l'obtention du réactif désiré devrait dorénavant être moins périlleux.

F. Conclusion et Perspectives

L'objectif général de ce projet de maîtrise était de caractériser le récepteur Ly49B. Pour ce faire, nous avons entrepris de produire un anticorps monoclonal spécifique de ce récepteur. Après 2 ans d'essais, de mises au point et de préparation de 3 immunogènes différents, nous avons finalement obtenu, croyons-nous, l'anticorps recherché. En effet, nous avons isolé un hybridome qui sécrète un anticorps qui se lie aux cellules Jurkat T transfectées avec le récepteur Ly49B, mais pas aux cellules Jurkat T parentales.

Avant de commencer la caractérisation du récepteur à l'aide de l'anticorps, il faudra d'abord s'assurer que cet anticorps ne se lie qu'au récepteur Ly49B. Il sera intéressant de vérifier si, par hasard, un des 7 phages recombinants qui expriment des séquences uniques au récepteur Ly49B ne contiendrait pas l'épitope de l'anticorps. Étant donné que les séquences du récepteur insérées dans les phages ne sont présentes que chez le récepteur Ly49B, si un résultat positif était obtenu, on pourrait conclure que l'anticorps est spécifique à Ly49B. Il est aussi possible que l'épitope de l'anticorps soit conformationnel ou que nous ne l'ayons pas inclu dans un phage. Ainsi, si aucune réactivité avec les phages n'est détectée, il faudra marquer des cellules transfectées individuellement avec les ADNc de tous les récepteurs Ly49 qui ont été clonés à ce jour pour confirmer la monospécificité de l'anticorps. Des analyses avec des cellules transfectées avec les ADNc de Ly49A et Ly49C qui sont considérés être les récepteurs prototypes des groupes A-like et C-like nous donneront déjà de précieux renseignements.

Ensuite, l'anticorps pourra enfin être utilisé pour caractériser le récepteur Ly49B. Tout d'abord, il sera intéressant d'analyser l'expression de ce récepteur sur différents types cellulaires et de comparer son expression chez différentes souches de souris. Les informations disponibles laissent croire que nous le retrouverons sur des précurseurs de cellules NK présents dans la moelle osseuse (Williams *et al*; 2000). Une telle découverte pourrait confirmer l'hypothèse que ce récepteur a un rôle très important lors du développement des cellules NK. Il sera aussi possible de déterminer la modulation de son expression

selon l'haplotype H-2 de la souris et ainsi peut-être avoir une idée concernant son ligand, à condition que toutefois celui-ci soit une molécule du CMH de classe I et que ce récepteur se plie à l'hypothèse de la calibration des récepteurs. Cependant, étant donné les grandes différences dans la séquence protéique de ce récepteur par rapport aux séquences consensus de la famille Ly49 et ce même à des sites potentiels de liaison du ligand, il se pourrait bien que ce récepteur se lie à un autre type de molécule. Il sera aussi intéressant de vérifier la capacité du récepteur Ly49B à inhiber la cellule NK, car bien qu'il contienne un ITIM, ceci n'a jamais été démontré. Ceci pourra être déterminé en vérifiant si, dans les cellules Jurkat transfectées, le pontage du récepteur Ly49B avec l'anticorps permet l'inhibition du signal transmis lorsqu'il y a activation de la cellule par le TCR. Cette méthode est déjà bien établie dans notre laboratoire (Chalifour *et al*; manuscrit soumis pour publication). Finalement, il sera aussi possible de vérifier, par immunoprécipitation, si le récepteur Ly49B recrute la phosphatase SHP-1, ce qui nous donnerait aussi une bonne idée sur la capacité inhibitrice du récepteur. Les possibilités d'analyses avec ce nouvel anticorps sont infiniment grandes et seul l'avenir nous dira ce que la particularité du récepteur Ly49B nous réserve comme surprise.

Liste des références

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. « Functional diversity of helper T lymphocytes ». Nature, vol. 383, p. 787-793.
- Arase H, Arase N, Saito T. 1995. « Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells ». J Exp Med, vol. 181, p. 1235-1238.
- Bazin H. 1990. Rat hybridomas and rat monoclonal antibodies, « Chapitre 6.1 Fusion procedure » AM Ravoet & H Bazin, CRC Press inc, Boca Raton, Floride, p.94
- Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. 1997. « Mouse CD1-specific NK1 T cells : development, specificity, and function ». Annu Rev Immunol, vol. 1997, p. 535-562.
- Berg SF, Dissen E, Westgaard IH, Fossum S. 1998. « Two genes in the rat homologous to human NKG2 ». Eur J Immunol, vol. 28, p. 444-450.
- Binstadt BA, Brumbaugh KM, Dick CJ, Scharenberg AM, Williams BL, Colonna M, Lanier LL, Kinet JP, Abraham RT, Leibson PJ. 1996. « Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation ». Immunity, vol. 5, p. 629-638.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. 1999. « Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines ». Annu Rev Immunol, vol. 17, p. 189-220.
- Brennan J, Mager D, Jefferies W, Takei F. 1994. « Expression of different members of the Ly-49 family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties ». J Exp Med, vol. 180, p. 2287-2295.
- Brennan J, Takei F, Wong S, Mager DL. 1995. « Carbohydrate recognition by a natural killer cell receptor, Ly-49C ». J Biol Chem, vol. 270, p. 9691-9694.
- Brennan J, Mahon G, Mager DL, Jefferies WA, Takei F. 1996a. « Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by Ly-49 : Specificities and domain interactions ». J Exp Med, vol. 183, p. 1553-1559.
- Brennan J, Lemieux S, Freeman JD, Mager DL, Takei F. 1996b. « Heterogeneity among Ly-49C natural killer (NK) cells : characterization of highly related receptors with differing functions and expression patterns ». J Exp Med, vol. 184, p. 2085-2090.

Brown MG, Fulmek S, Matsumoto K, Cho R, Lyons PA, Levy ER, Scalzo AA, Yokoyama WM. 1997. « A 2-Mb contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6 ». Genomics, vol. 42, p. 16-25.

Brown MG, Zhang J, Du Y, Stoll J, Yokoyama WM, Scalzo AA. 1999. « Localization on a physical map of the NKC-linked *Cmv1* locus between *Ly49b* and the *Prp* gene cluster on mouse chromosome 6 ». J Immunol, vol. 163, p. 1991-1999.

Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, Barclay AN. 1998. « 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48 ». J Exp Med, vol. 188, p. 2083-2090.

Brumbaugh KM, Binstadt BA, Billadeau DD, Schoon RA, Dick CJ, Ten RM, Leibson PJ. 1997. « Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity ». J Exp Med, vol. 186, p. 1965-1974.

Bull C, Sobanov Y, Rohrdanz B, O'Brien J, Lehrach, Hofer E. 2000. « The centromeric part of human NK gene complex : linkage of LOX-1 and LY49L with the CD94/NKG2 region ». Genes Immunol, vol. 1, p. 280-287.

Burshtyn DN, Yang W, Yi T, Long EO. 1997. « A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1 ». J Biol Chem, vol. 272, p. 13066-13072.

Carlyle JR, Martin A, Mehra A, Attisano L, Tsui FW, Zuniga-Pflucker JC. 1999. « Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function ». J Immunol, vol. 162, p.5917-5923.

Chalifour A, Roger J, Lemieux S, Duplay P. 2001. « Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with TCR-mediated activation ». soumis pour publication

Chang CS, Silver ET, Kane KP. 1999. « Generation of a monoclonal antibody that recognizes a polymorphic epitope of C57BL/6 Ly-49G2 ». Hybridoma, vol. 18, p. 423-429.

Coles MC, McMahon CW, Takizawa H, Raulet DH. 2000. « Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors ». Eur J Immunol, vol. 30, p. 236-244.

Colonna M, Samaridis J. 1995. « Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by natural killer cells ». Science, vol. 268, p. 405-408.

Corral L, Takizawa H, Hanke T, Jamieson AM, Raulet DH. 1999. « A new monoclonal antibody reactive with several Ly49 NK cell receptors mediates redirected lysis of target cells ». Hybridoma, vol. 18, p. 359-366.

Correa I, Raulet DH. 1995. « Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells ». Immunity, vol. 2, p. 61-71.

Daniels BF, Nakamura MC, Rosen SD, Yokoyama WM, Seaman WE. 1994. « Ly-49A, a receptor for H-2D^d, has functional carbohydrate recognition domain ». Immunity, vol. 1, p. 785-792.

Daniels KA, Devora G, Lai WC, O'Donnell CL, Bennett M, Welsh RM. 2001. « Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H ». J Exp Med, vol. 194, p. 29-44.

Dépatie C, Chalifour A, Paré C, Lee S-H, Vidal SM, Lemieux S. 1999. « Assessment of Cmv1 candidates by genetic mapping and *in vivo* antibody depletion of NK cell subsets ». Int Immunol, vol. 11, p. 1541-1551.

Dépatie C, Lee S-H, Stafford A, Avner P, Belouchi A, Gros P, Vidal SM. 2000. « Sequence-ready BAC contig, physical, and transcriptional map of a 2-Mb region overlapping the mouse chromosome 6 host-resistance locus cmv1 ». Genomics, vol. 64, p. 161-174.

Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. 2000. « Ligands for the murine NKG2D receptor : expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages ». Nat Immunol, vol. 1, p. 119-126.

Dissen E, Ryan JC, Seaman WE, Fossum S. 1996. « An autosomal dominant locus, Nka, mapping to the Ly-49 region of a rat natural killer (NK) gene complex, controls NK cell lysis of allogeneic lymphocytes ». J Exp Med, vol. 183, p. 2197-2207.

Eriksson M, Leitz G, Fällman E, Axner O, Ryan JC, Nakamura MC, Sentman CL. 1999. « Inhibitory receptors alter natural killer cell interactions with target cells yet allow simultaneous killing of susceptible targets ». J Exp Med, vol. 190, p. 1005-1012.

Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, Van Deusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechsler M, Goodsaid F, Caligiuri MA. 1999. « Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12 : implications for the innate immune response ». J Immunol, vol. 162, p. 4511-4520.

Franksson L, Sundbäck J, Achour A, Bernlind J, Glas R, Kässe K. 1999. « Peptide dependency and selectivity of the NK cell inhibitory receptor Ly-49C ». Eur J Immunol, vol. 29, p. 2748-2758.

George T, Yu YY, Liu J, Davenport C, Lemieux S, Stoneman E, Mathew PA, Kumar V, Bennett M. 1997. « Allorecognition by murine natural killer cells: lysis of T-lymphoblasts and rejection of bone-marrow grafts ». Immunol Rev, vol. 155, p. 29-40.

George TC, Mason LH, Ortaldo JR, Kumar V, Bennett M. 1999. « Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells ». J Immunol, vol. 162, p. 2035-2043.

Giorda R, Rudert WA, Vavassori C, Chambers WH, Hiserodt JC, Trucco M. 1990. « NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells ». Science, vol. 249, p. 1298-1300.

Giorda R, Trucco. 1991. « Mouse NKR-P1. A family of genes selectively coexpressed in adherent lymphokine-activated killer cells ». J Immunol, vol. 147, p. 1701-1708.

Giorda R, Weisberg EP, Ip TK, Trucco M. 1992. « Genomic structure and strain-specific expression of the natural killer cell receptor ». J Immunol, vol. 149, p. 1957-1963.

Glimcher L, Shen FW, Cantor H. 1977. « Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell ». J Exp Med, vol. 145, p. 1-9.

Gosselin P, Lusignan Y, Brennan J, Takei F, Lemieux S. 1997. « The NK2.1 receptor is encoded by Ly-49C and its expression is regulated by MHC class I alleles ». Int Immunol, vol. 9, p. 533-540.

Gosselin P, Mason LH, Willette-Brown J, Ortaldo JR, McVicar DW. 1999. « Induction of DAP12 phosphorylation, calcium mobilization, and cytokine secretion by Ly49H ». J Leuk Biol, vol. 66, p. 165-171.

Grinna , Tschopp JF. 1989. « Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* ». Yeast, vol. 5, p. 107-115.

Hahne M, Renno T, Schrotter M, Irmeler M, French L, Bornard T, MacDonald HR, Tschopp J. 1996. « Activated B cells express functional Fas ligand ». Eur J Immunol, vol. 26, p. 721-724.

Hanke T, Takizawa H, McMahon CW, Basch DH, Paner EG, Miller JD, Altman JD, Liu Y, Cado D, Lemonnier FA, Bjorkman PJ, Raulet DH. 1999. « Direct

assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors ». Immunity, vol. 11, p. 67-77.

Held W, Kunz B, Ioannidis V, Lowin-Kropf B. 1999. « Mono-allelic Ly49 NK cell receptor expression ». Semin Immunol, vol. 11, p. 349-355.

Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. 1975. « Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells ». Int J Cancer, vol. 16, p. 230-239.

Hoglund P, Sundback J, Olsson-Alheim MY, Johansson M, Salcedo M, Ohlen C, Ljunggren HG, Sentman CL, Karre K. 1997. « Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse ». Immunol Rev, vol. 155, p. 11-28.

Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. 1991. « DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on natural killer cells ». J Exp Med, vol. 173, p. 1017-1020.

Huyer G, Alexander DR. 1999. « Immune signalling: SHP-2 docks at multiple ports ». Curr Biol, vol. 9, p. R129-R132.

Idris AH, Smith HRC, Mason LH, Ortaldo JR, Scalzo AA, Yokoyama WM. 1999. « The natural killer gene complex genetic locus *Chok* encodes Ly-49D, a target recognition receptor that activates natural killing ». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 96, p. 6330-6335.

Jin L, Fendly BM, Wells JA. 1992. « High resolution functional analysis of antibody-antigen interactions ». J Mol Biol, vol. 226, p. 851-865.

Johansson MH, Höglund E, Nakamura MC, Ryan JC, Höglund P. 1998. « $\alpha 1/\alpha 2$ domains of H-2D^d, but not H-2L^d, induce « missing self » reactivity *in vivo* – No effect of H-2L^d on protection against NK cells expressing the inhibitory receptor Ly49G2 ». Eur J Immunol, vol. 28, p. 4198-4206.

Karlhofer FM, Yokoyama WM. 1991. « Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for NK1.1 antigen. IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways ». J Immunol, vol. 146, p. 3662-3673.

Karlhofer Fribaudo RK, Yokoyama WM. 1992. « MHC class I alloantigen specificity of Ly49+ IL-2-activated natural killer cells ». Nature, vol. 358, p. 66-70.

Kärre K. 1997. « How to recognize a foreign submarine ». Immunol Rev, vol. 155, p. 5-9.

Kato K, Koyanagi M, Okada H, Takanashi T, Wong Yw, Williams AF, Okumura K, Yagita H. 1992. « CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation ». J Exp Med, vol. 176, p. 1241-1249.

Kiener PA, Davis PM, Starling GC, Mehlin C, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Liles WC. 1997. « Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages ». J Exp Med, vol. 185, p. 1511-1516.

Kiessling R, Klein E, Wigzell H. 1975. « Natural killer cells in the mouse. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype ». Eur J Immunol, vol. 5, p. 112-117.

Krystal G. 2000. « Lipid phosphatases in the immune system ». Semin Immunol, vol. 12, p. 397-403.

Kubo S, Itoh Y, Ishikawa N, Nagasawa R, Mitarai T, Maruyama N. 1993. « The gene encoding the mouse lymphocyte antigen Ly-49 : structure analysis and the 5'-flanking sequence ». Gene, vol. 136, p. 329-331.

Kubota A, Lian RH, Lohwasser S, Salcedo M, Takei F. 1999a. « IFN γ production and cytotoxicity of IL-2-activated murine NK cells are differentially regulated by MHC class I molecules ». J Immunol, vol. 163, p. 6488-6493.

Kubota A, Kubota S, Lohwasser S, Mager DL, Takei F. 1999b. « Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice ». J Immunol, vol. 163, p.212-216.

Kubota K. 1997. « A killer cell protective antigen expressed by MHC-unrestricted killer hybridomas ». Cell Immunol, vol. 181, p. 50-58.

Kung SKP, Su R-C, Shannon J, Miller RG. 1999. « The NKR-P1B gene product is an inhibitory receptor on SJL/J NK cells ». J Immunol, vol. 162, p.5876-5887.

Lai WC, Zhang Y, George T, Sivakumar PV, Stepp S, Zhou D, Bennett M, Kumar V, Schatzle JD. 1999. « Generation of antibodies to cell surface markers on mature NK cells ». In Natural killer cell protocols : functions, receptors, and clinical applications; Methods in molecular biology; Totowa, NJ; K.S. Campbell and M. Colonna, eds; Human Press inc, p.211-217.

Lanier LL. 1998. « NK cell receptors ». Annu Rev Immunol, vol. 16, p. 359-393.

Lanier LL. 2000. « Turning on natural killer ». J Exp Med, vol. 191, p. 1259-1262.

Lanier LL, Chang C, Phillips JH. 1994. « Human NKP-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes ». J Immunol, vol. 153, p. 2417-2428.

Lanier LL, Corliss B, Wu J, Phillips JH. 1998. « Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors ». Immunity, vol. 8, p. 693-701.

Lemieux S, Ouellet-Talbot F, Lusignan Y, Morelli L, Labreche N, Gosselin P, Lecomte J. 1991. « Identification of murine natural killer cell subsets with monoclonal antibodies derived from 129 anti-C57BL/6 immune spleen cells ». Cell Immunol, vol. 134, p.191-204.

Lian RH, Li Y, Kubota S, Mager DL, Takei F. 1999. « Recognition of class I MHC by NK receptor Ly-49C : Identification of critical residues ». J Immunol, vol. 162, p. 7271-7276.

Lijnen HR, Lasters I, Verstreken M, Collen D, Jespers L. 1997. « Screening panels of monoclonal antibodies using phage-displayed antigen » Anal Biochem, vol. 248, p. 211-215.

Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. 1996. « Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes : implications for the regulation of apoptosis in neutrophils ». J Exp Med, vol. 184, p. 429-440.

Liu C-C, Perussia B, Young JD. 2000. « The emerging rôle of IL-15 in NK-cell development ». Immunol Today, vol. 21, p. 113-116.

Ljunggren HG, Kärre K. 1990. « In search of the missing self ? MHC class I molecules and NK cell recognition ». Immunol Today, vol. 11, p. 237-244.

Lohwasser S, Hande P, Mager D, Takei F. 1999. « Cloning of murine NKG2A, B and C : second family of C-type lectin receptors on murine NK cells ». Eur J Immunol, vol. 29, p. 755-761.

Long EO. 1999. « Regulation of immune responses through inhibitory receptors ». Annu Rev Immunol, vol. 17, p. 875-904.

Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, Peruzzi M, Rajagopalan S, Rojo S, Wagtmann N, Winter CC. 1997. « Killer cell inhibitory receptors : diversity, specificity, and function ». Immunol Rev, vol.155, p. 135-144.

Lövik G, Vaage JT, Naper C, Benestad HB, Rolstad B. 1995. « Recruitment of alloreactive natural killer cells to the rat peritoneum by a transfected cell line secreting rat recombinant interleukin-2 ». J Immunol Methods, vol. 179, p. 59-69.

Maghazachi AA. 1991. « Tumor necrosis factor- α is chemokinetic for lymphokine-activated killer cells : regulation by cyclic adenosine monophosphate ». J Leuk Biol, vol. 49, p. 302-308.

Makrigiannis AP, Gosselin P, Mason LH, Taylor LS, McVicar DW, Ortaldo JR, Anderson SK. 1999. « Cloning and characterization of a novel activating Ly49 closely related to Ly49A ». J Immunol, vol. 163, p. 4931-4938.

Makrigiannis AP, Etzler J, Winkler-Pickett R, Mason A, Ortaldo JR, Anderson SK. 2000. « Identification of the Ly49L protein : evidence for activating counterparts to inhibitory Ly49 proteins ». J Leuk Biol, vol. 68, p. 765-771.

Makrigiannis AP, Pau AT, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR, Anderson SK. 2001a. « Class I MHC-binding characteristics of the 129/J Ly49 repertoire ». J Immunol, vol. 166, p. 5034-5043.

Makrigiannis AP, Anderson SK. 2001b. « Mechanisms controlling the expression and diversity of the Ly49 gene family ». Mod Asp Immunobiol, vol. 1, p. 228-232.

Mandelboim O, Reyburn HT, Valés-Gómez M, Pazmany L, Colonna M, Borsellino G, Strominger J. 1996. « Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility complex molecules ». J Exp Med, vol. 184, p. 913-922.

Mason LH, Anderson SK, Yokoyama WM, Smith HR, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR. 1996. « The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells ». J Exp Med, vol. 184, p. 2119-2128.

Matsumoto N, Ribaudo RK, Abastado JP, Margulies DH, Yokoyama WM. 1998. « The lectin like NK cell receptor Ly49A recognizes a carbohydrate independent epitope on its MHC ligand ». Immunity, vol. 8, p. 245-254.

McLean BW, Bray MR, Boraston AB, Gilkes NR, Haynes CA, Kilburn DG. 2000. « Analysis of binding of the family 2a carbohydrate-binding module from *Cellulomonas fimi* xylanase 10A to cellulose : specificity and identification of functionally important aminoacid residues ». Protein Eng, vol. 13, p. 801-809.

McQueen KL, Freeman JD, Takei F, Mager DL. 1998. « Localisation of five new Ly49 genes, including three closely related to Ly49c ». Immunogenetics, vol. 48, p. 174-183.

McQueen KL, Lohwasser S, Takei F, Mager DL. 1999. « Expression analysis of new Ly49 genes : most transcripts of Ly49j lack the transmembrane domain ». Immunogenetics, vol. 49, p. 685-691.

McVicar DW, Taylor LS, Gosselin P, Willette-Brown J, Mikhael AI, Geahlen RL, Nakamura MC, Linnemeyer P, Seaman WE, Anderson SK, Ortaldo JR, Mason LH. 1998. « DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for Syk protein-tyrosine kinase ». J Biol Chem, vol. 273, p. 32934-32942.

Michaëlsson J, Achour A, Salcedo M, Kase-Sjöströmi A, Sundbäck J, Harris RA, Kärre K. 2000. « Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity with soluble major histocompatibility complex class I tetramers ». Eur J Immunol, vol. 30, p. 300-307.

Morelli L, Lusignan Y, Lemieux S. 1992. « Heterogeneity of natural killer cell subset in NK-1.1⁺ and NK-1.1⁻ inbred mouse strains and their progeny ». Cell Immunol, vol. 141, p. 148-160.

Moretta A, Poggi A, Pende D, Tripodi G, Orengo AM, Pella N, Augugliaro R, Bottino C, Ciccone E, Moretta L. 1991. « CD-69 mediated pathway of lymphocyte activation : anti-CD69 monoclonal antibodies trigger cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta » J Exp Med, vol. 174, p. 1393-1398.

Nagata S. 1999. « Fas ligand-induced apoptosis ». Annu Rev Genet, vol. 33, p. 29-55.

Nakamura MC, Linnemeyer PA, Niemi EC, Mason LH, Ortaldo JR, Ryan JC, Seaman WE. 1999. « Mouse Ly-49D recognizes H-2D^d and activates natural killer cell cytotoxicity ». J Exp Med, vol. 189, p. 493-500.

Nakamura MC, Hayashi S, Niemi EC, Ryan JC, Seaman WE. 2000. « Activating Ly-49D and inhibitory Ly-49A natural killer cell receptors demonstrate distinct requirements for interaction with H2-D^d ». J Exp Med, vol. 192, p. 447-453.

Natarajan K, Boyd LF, Schuck P, Yokoyama WM, Eilat D, Margulies DH. 1999. « Interaction of the NK cell inhibitory receptor Ly49A with H-2D^d : Identification of a site distinct from the TCR site ». Immunity, vol. 11, p. 591-601.

Olcese L, Cambiaggi A, Semenzato G, Bottino C, Moretta A, Vivier E. 1997. « Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells ». J Immunol, vol. 158, p. 5083-5086.

Olivero S, Bléry M, Vivier E. 1998. « Régulation de l'activation cellulaire par les phosphatases ». Médecine/Science, vol. 14, p. 262-268.

Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. 1995. « Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration ». J Exp Med, vol. 182, p. 1045-1056.

Orihuela M, Margulies DH, Yokoyama WM. 1996. « The natural killer cell receptor Ly49A recognizes a peptide-induced conformational determinant on its major histocompatibility complex class I ligand ». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 93, p. 11792-11797.

Ortaldo JR, Mason AT, Winkler-Pickett R, Raziuddin A, Murphy WJ, Mason LH. 1999. « Ly-49 receptor expression and functional analysis in multiple mouse strains ». J Leuk Biol, vol. 66, p. 512-520.

Ortaldo JR, Bere EW, Hodge D, Yong HA. 2001. « Activating Ly-49 NK receptors : central role in cytokine and chemokine production ». J Immunol, vol. 166, p. 4994-4999.

Peruzzi M, Parker KC, Long EO, Malnati MS. 1996a. « Peptide sequence requirements for the recognition of HLA-B2705 by specific natural killer cells ». J Immunol, vol. 157, p. 3350-3356.

Peruzzi M, Wagtmann N, Long EO. 1996b. « A p70 killer cell inhibitory receptor specific for several HLA-B allotypes discriminates among peptides bound to HLA-B2705 ». J Exp Med, vol. 184, p. 1585-1590.

Peters PM, Svedersky LP, Shalaby MR, Palladino MA. 1985. « Interferon gamma : more than a MAF ». Lymphokine Res, vol. 4, p. 265-273.

Pilaro AM, Taub DD, McCormick KL, Williams HM, Sayers TJ, Folger WE, Wilttrout RH. 1994. « TNF- α is a principal cytokine involved in the recruitment of NK cells to liver parenchyma ». J Immunol, vol. 153, p. 333-342.

Popkov M, Lussier I, Medvedkine V, Estève P-O, Alakhov V, Mandeville R. 1998. «Multidrug-resistance drug-binding peptides generated by using a phage display library». Eur J Biochem, vol. 251, p. 155-163.

Popkov M, Sidrac-Ghali S, Alakhov V, Mandeville R. 2000. « Epitope-specific antibody response to HT-1080 fibrosarcoma cells by mimotope immunization ». Clin Cancer Res, vol. 6, p. 3629-3635.

Qu CK, Yu WM, Azzarelli B, Feng GS. 1999. « Genetic evidence that SHP-2 tyrosine phosphatase is a signal enhancer of the epidermal growth factor receptor in mammals ». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 96, p. 8528-8533.

Rojo S, Burshtyn DN, Long EO, Wagtmann N. 1997. « Type I transmembrane receptor with inhibitory function in mouse mast cells and NK cells ». J Immunol, vol. 158, p. 9-12.

Roland J & Cazenaze PA. 1992. « Ly-49 antigen defines an $\alpha\beta$ TCR population in i-IEL with an extrathymic maturation ». Int Immunol, vol. 4, p. 699-706.

Ryan JC, Turck J, Niemi EC, Yokoyama WM, Seaman WE. 1992. « Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules ». J Immunol, vol. 149, p. 1631-1635.

Ryan JC, Niemi EC, Nakamura MC, Seaman WE. 1995. « NKR-P1A is a target-specific receptor that activates natural killer cell cytotoxicity ». J Exp Med, vol. 181, p. 1911-1915.

Salcedo M, Colucci F, Dyson J, Cotterill LA, Lemonnier FA, Kourilsky P, Di Santo JP, Ljunggren H-G, Abastado J-P. 2000. « Rôle of Qa-I^b-binding receptors in the specificity of developing NK cells ». Eur J Immunol, vol. 30, p. 1094-1101.

Scharton TM, Scott P. 1993. « Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cells subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice ». J Exp Med, vol. 178, p. 567-577.

Scott JK, Smith GP. 1990. « Searching for peptide ligands with an epitope library ». Science, vol. 249, p. 386-390.

Scott P, Trinchieri G. 1995. « The role of natural killer cells in host-parasite interactions ». Curr Op Immunol, vol. 7, p. 34-40.

Seaman WE. 2000. « Natural killer cells and natural killer T cells ». Arthritis & Rheumatism, vol. 43, p. 1204-1217.

Sentman CL, Olsson MY, Karre K. 1995. « Missing self recognition by natural killer cells in MHC class I transgenic mice. A 'receptor calibration' model for how effector cells adapt to self ». Semin Immunol, vol. 7, p. 109-119.

Sewell WA, Brown MH, Owen MJ, Fink PJ, Kozak CA, Crumpton MJ. 1987. « The murine homologue of the T lymphocyte CD2 antigen : molecular cloning, chromosome assignment and cell surface expression ». Eur J Immunol, vol. 17, p. 1015-1020.

Shah N, Scully MF, Ellis V, Kakkar VV. 1990. « Influence of chemical modification of tryptophan residues on the properties of human antithrombin III ». Tromb Res, vol. 57, p. 343-352.

Sharp PM, Cowe E, Higgins DG, Shields DC, Wolfe KH, Wright F. 1988. « Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity ». Nucleic Acides Res, vol. 16, p. 8207-8211.

Shi F, Ljunggren HG, Sarvetnick N. 2001. « Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction ». Trends Immunol, vol. 22, p. 97-101.

Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. 1992. « RAG-2-deficient mice lack mature

lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement ». Cell, vol. 68, p. 855-867.

Silver ET, Lau JC, Kane KP. 1999. « Molecular cloning of mouse NKG2A and C ». Immunogenetics, vol. 49, p. 727-730.

Silver ET, Gong D-E, Chang CS, Amrani A, Santamaria P, Kane KP. 2000. « Ly-49P activates NK-mediated lysis by recognizing H-2D^d ». J Immunol, vol. 165, p. 1771-1781.

Silver ET, Gong D-E, Hazes B, Kane KP. 2001. « Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H-2D^k and H-2D^d ». J Immunol, vol. 166, p. 2333-2341.

Smith HRC, Karlhofer FM, Yokoyama WM. 1994. « Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated NK cells ». J Immunol, vol. 153, p. 1068-1079.

Smith HRC, Chuang HH, Wang LL, Salcedo M, Heusel JW, Yokoyama WM. 2000. « Nonstochastic coexpression of activation receptors on murine natural killer cells ». J Exp Med, vol. 191, p. 1341-1354.

Smith KM, Wu J, Bakker ABH, Phillips JH, Lanier LL. 1998. « Cutting edge : Ly49D and Ly49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors ». J Immunol, vol. 161, p. 7-10.

Smyth MJ, Kelly JM, Baxter AG, Korner H, Sedgewick JD. 1998. « An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum ». J Exp Med, vol. 188, p. 1611-1619.

Spits H, Lanier LL, Phillips JH. 1995. « Development of human T and natural killer cells ». Blood, vol. 85, p. 2654-2670.

Su R-C, Kung SK, Silver ET, Lemieux S, Kane KP, Miller RG. 1999. « Ly-49C^{B6} NK inhibitory receptor recognizes peptide-receptive H-2K^b ». J Immunol, vol. 163, p. 5319-5330.

Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S. 1995. « Expression of the Fas ligand in cells of the T cell lineage ». J Immunol, vol. 154, p. 3806-3813.

Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, Arai K, Yoshida M, Arai N. 1988. « SR alpha promoter : an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat ». Mol Cell Biol, vol. 8, p. 466-472.

Takei F, Brennan J, Mager DL. 1997. « The Ly-49 family : genes, proteins and recognition of class I MHC ». Immunol Rev, vol. 155, p. 67-77.

Takei F, McQueen KL, Maeda M, Wilhelm BT, Lohwasser S, Lian RH, Mager DL. 2001. « Ly49 and CD94/NKG2 : developmentally regulated expression and evolution ». Immunol Rev, vol. 181, p. 90-103.

Tanamachi DM, Hanke T, Takizawa H, Jamieson AM, Raulet DH. 2001. « Expression of natural killer receptor alleles at different Ly49 loci occurs independently and is regulated by major histocompatibility complex class I molecules ». J Exp Med, vol. 193, p. 307-315.

Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. 1994. « The CD69 receptor : a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells ». Immunol Today, vol. 15, p. 479-483.

Tomasello E, Bléry M, Vély E, Vivier E. 2000. « Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells ». Semin Immunol, vol. 12, p. 139-147.

Tormo J, Natarajan K, Margulies DH, Marluza RA. 1999. « Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand ». Nature, vol. 402, p. 623-631.

Trinchieri G. 1989. « Biology of natural killer cells ». Adv Immunol, vol. 47, p. 187-376.

Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienertweidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P. 1997. « Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes ». Immunity, vol. 7, p. 753-763.

Valadon P, Scharff MD. 1996. « Enhancement of ELISAs for screening peptides in epitope phage display libraries ». J Immunol Methods, vol. 197, p. 171-179.

Van Beneden K, Stevenaert F, De Creus A, Debacker V, De Boever J, Plum J, Leclercq G. 2001. « Expression of Ly49E and CD94/NKG2 on fetal and adult NK cells ». J Immunol, vol. 166, p. 4302-4311.

Vance RE, Kraft JR, Altman JD, Jensen PE, Raulet DH. 1998. « Mouse CD94/NKG2 is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1^b ». J Exp Med, vol. 188, p. 1841-1848.

Vance RE, Jamieson AM, Raulet DH. 1999. « Recognition of the class Ib molecule Qa-1^b by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells ». J Exp Med, vol. 190, p. 1801-1812.

Vély F, Vivier E. 1996. « Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK ». Médecine/Science, vol. 12, p. 458-464.

Vély F, Viver E. 1997. « Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts ». J Immunol, vol. 159, p. 2075-2077.

Vivier E, Daeron M. 1997. « Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs ». Immunol Today, vol. 18, p. 286-291.

Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Manati MS, Vitale M, Bottino C, Moretta L, Long EO. 1995. « Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains ». Immunity, vol. 2, p. 439-449.

Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. 1998. « The C-type lectin superfamily in the immune system ». Immunol Rev, vol. 163, p. 19-34.

Whiteside TL, Vujanovic NL, Herberman RB. 1998. « Natural killer cells and tumor therapy ». Curr Top Microbiol Immunol, vol. 230, p. 221-244.

Williams NS, Kubota A, Bennett M, Kumar V, Takei F. 2000. « Clonal analysis of NK cell development from bone marrow progenitors *in vitro* : orderly acquisition of receptor gene expression ». Eur J Immunol, vol. 30, p. 2074-2082.

Wong S, Freeman JD, Kelleher C, Mager D, Takei F. 1991. « Ly-49 multigene family. New members of a superfamily of type II membrane proteins with lectin-like domains ». J Immunol, vol. 147, p. 1417-1423.

Yokoyama WM. 1997. « The mother-child union : the case of missing-self and protection of the fetus ». Proc Natl Acad Sci USA, vol. 94, p. 5998-6000.

Yokoyama WM. 1998. « Natural killer cell receptors ». Curr Op Immunol, vol. 10, p. 298-305.

Yokoyama WM, Kehn PJ, Cohen DI, Shevach M. 1990. « Chromosomal location of the Ly-49 (A1, YE1/48) multigene family : genetic association with the NK1.1 antigen ». J Immunol, vol. 145, p. 2353-2358.

Yokoyama WM, Ryan JC, Hunter JJ, Smith HRC, Stark M, Seaman WE. 1991. « cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with Ly-49 : identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6 ». J Immunol, vol. 147, p. 3229-3236.

Annexe 1 : Milieux, tampons et solutions

2XTY : 1,6% bacto-tryptone
 1% extrait de levure
 0,5% NaCl

BMGY (milieu « buffered glycerol-complex ») :
 1% extrait de levure
 2% peptone
 100 mM phosphate de potassium pH 6,0
 1,34% « yeast nitrogen base »
 4×10^{-5} % biotine
 1% glyc  rol

BMMY (milieu « buffered methanol-complex ») :
 1% extrait de levure
 2% peptone
 100 mM phosphate de potassium pH 6,0
 1,34% « yeast nitrogen base »
 4×10^{-5} % biotine
 0,5% méthanol

DMEMc : DMEM concentré en glucose avec L-glutamine additionné de :
 50 μ M 2-ME
 100 U/ml pénicilline
 100 μ g/ml streptomycine
 1% acides aminés non-essentiels
 2.5 μ g/ml fungizone

DMEMc-H-P :
 DMEMc additionné de :
 10 mM hepes
 1 mM sodium pyruvate
 20% SVF

DMEMc-H-P-HAT :
 DMEMc-H-P additionné de :
 1×10^{-4} M hypoxanthine
 4×10^{-7} M aminopt  rine
 $1,6 \times 10^{-5}$ M thymidine

DMEMc-H-P-HT :
 DMEMc-H-P additionné de :
 1×10^{-4} M hypoxanthine
 $1,6 \times 10^{-5}$ M thymidine

LB (milieu Luria-Bertani) :

1% Bacto-tryptone
0,5% extrait de levure
1% NaCl
pH 7,0

LBfs (milieu Luria-Bertani faible en sel) :

1% Bacto-tryptone
0,5% extrait de levure
0,5% NaCl
pH 7,0

NAP :

80 mM NaCl
50 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

PBS (eau salée physiologique tamponnée) :

150 mM NaCl
pH 7,4

PEG/NaCl : 16,7% PEG 8000

3,3 M NaCl

RPMIc :

RPMI 1640 additionné de :
25 mM hepes
100 U/ml pénicilline
100 µg/ml streptomycine

SOC :

2% bacto-tryptone
0,5% extrait de levure
0.05% NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl_2
20 mM glucose

solution I (purification d'ADN) :

50 mM glucose
25 mM tris pH 8,0
10 mM EDTA

solution II (purification d'ADN) :

1% SDS
0,2 M NaOH

solution III (purification d'ADN) :

3 M potassium acétate
11,5% acide acétique

Tampon citrate :

61 mM acide citrique
77 mM Na_2HPO_4
pH 4,0

TBS :

50 mM tris
150 mM NaCl
pH 7,5

TE :

10 mM tris-HCl
1 mM EDTA
pH 8,0

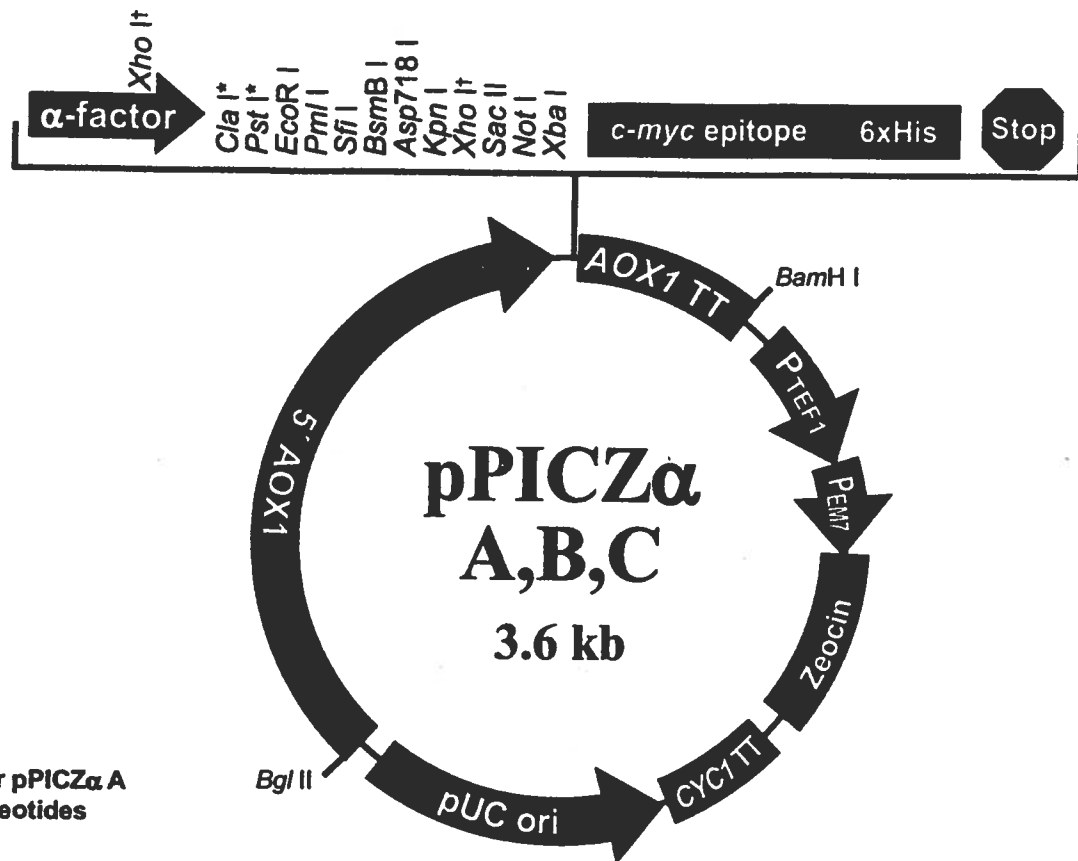
YPD (milieu « yeast extract peptone dextrose ») :

1% extrait de levure
2% peptone
2% dextrose

YPDS-zeocine :

1% extrait de levure
2% peptone
2% dextrose
1 M sorbitol
2% agar
50 ou 100 $\mu\text{g/ml}$ zeocine

Annexe 2 : Carte génomique du vecteur pPICZ α A



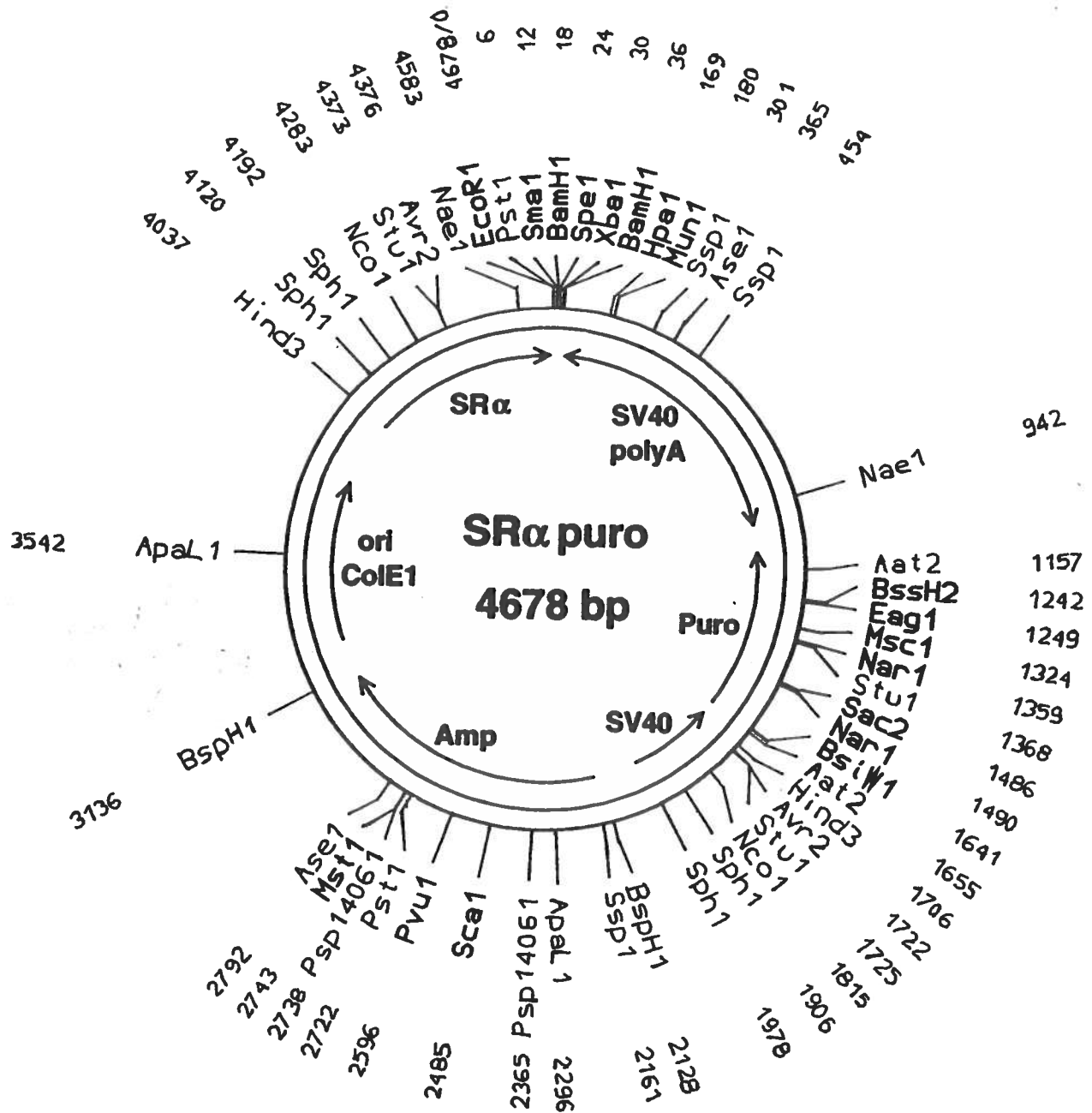
Comments for pPICZ α A 3593 nucleotides

5' *AOX1* promoter region: bases 1-941
 5' *AOX1* priming site: bases 855-875
 α -factor signal sequence: bases 941-1207
 α -factor priming site: bases 1144-1164
 Multiple cloning site: bases 1208-1276
c-myc epitope: bases 1275-1304
 Polyhistidine (6xHis) tag: bases 1320-1337
 3' *AOX1* priming site: bases 1423-1443
AOX1 transcription termination region: bases 1341-1682
TEF1 promoter: bases 1683-2093
EM7 promoter: bases 2095-2162
Sh ble ORF: bases 2163-2537
CYC1 transcription termination region: bases 2538-2855
 pUC origin: bases 2866-3539 (complementary strand)

* *Pst I* is in Version B only
Cla I is in Version C only

†The two *Xho I* sites in the vector allow the user to clone their gene in frame with the Kex2 cleavage site, resulting in expression of their native gene without additional amino acids at the N-terminus.

Annexe 3 : Carte génomique du vecteur SR α puro



No Sites for:

AflII, AgeI, ApaI, AscI, BbsI, BclI, BglII, BspEI, BsrGI, BstBI, Bst1107I, ClaI, DraIII, Eco47III, EcoRV, KpnI, MluI, NdeI, NheI, NotI, Nrul, NsiI ?, PacI, PmeI, PmlI, PvuII, Sall, ?, SapI, SnaBI, SrfI, SstI, SwaI, XcmI, XhoI

STRUCTURE OF THE POLYLINKER:

*Pst I Bam HI Xba I
 GAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTCTCTAGAGGATCC
 Eco RI Sma I Spe I Bam HI

*:Present elsewhere in the vector