

**Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier**

Propriétés fonctionnelles du récepteur Ly49C des cellules NK murines

**Par
Simon Girard**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)**

27 Mars 2000

RÉSUMÉ

Afin d'éclaircir les propriétés fonctionnelles du récepteur Ly49C des cellules NK murines, nous avons évalué, dans un premier temps, la concentration des ARNm spécifiques au TNF- α et à l'IFN- γ après stimulation cellulaire avec l'AcM anti-Ly49C 4LO3311. Ainsi, nous avons observé par RT-PCR quantitatif et par buvardage de type Northern que la stimulation des cellules LAK de souris BALB/c par l'AcM 4LO3311 induisait une nette augmentation de la concentration de ces ARNm et ce, dans de nombreuses expériences. Cependant, des expériences plus poussées utilisant des cellules triées sur la base de leur expression du récepteur Ly49C ont révélé que l'activation cellulaire ne semblait pas être induite de façon spécifique par la stimulation avec l'AcM 4LO3311. Nous en avons conclu que l'augmentation des ARNm spécifiques observée dans les cellules stimulées avec cet AcM était due à la présence d'un élément activateur inconnu dans les préparations d'AcM.

Parallèlement à cette première série d'expériences, l'effet de la stimulation cellulaire avec le même AcM sur la phosphorylation sur tyrosine des protéines cytoplasmiques a été analysé. Dans des conditions permettant l'induction de ce phénomène suite à une stimulation via le récepteur Fc γ RIIIA, aucun effet semblable n'a pu être observé dans les cellules LAK de souris BALB/c stimulées avec l'AcM 4LO3311. La variabilité des résultats générés dans cette partie de l'expérimentation n'a pas permis de conclure quant à la capacité activatrice du récepteur Ly49C.

D'autre part, l'association de protéines cytoplasmiques au récepteur Ly49C a également été étudiée. Utilisant un système de protéines de fusion ainsi que le buvardage de type Far Western, l'association des protéines tyrosine phosphatases SHP-1 et SHP-2 avec le domaine cytoplasmique phosphorylé du récepteur Ly49C a pu être mise en évidence. Le rôle de ces deux phosphatases dans la transmission d'un signal d'inhibition est connu, ce qui suggère que le récepteur Ly49C a la capacité d'enclencher un signal menant à l'inhibition des fonctions cellulaires suite à son engagement. La phosphorylation sur tyrosine du récepteur Ly49C a aussi été vérifiée dans un contexte *in*

situ après immunoprécipitation du récepteur à partir de cellules LAK de souris BALB/c stimulées avec du pervanadate de sodium. Ceci indique que sous sa forme native, le récepteur a la possibilité de recruter les deux protéine tyrosine phosphatases.

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier la Dr Suzanne Lemieux pour avoir accepté la direction de mes études de maîtrise et pour la qualité de la formation scientifique que j'ai reçue dans son laboratoire. Je remercie également la Dr Pascale Duplay pour sa contribution importante à mon projet de maîtrise, pour son support constant et pour ses conseils judicieux.

Je voudrais aussi remercier Yvette Lusignan pour son support technique, ses conseils grandement appréciés et son engagement à tous les égards envers le laboratoire. Je remercie aussi Joanne Roger pour son support technique et pour le plaisir que j'ai eu à travailler avec elle.

Je remercie le Dr Albert Descôteaux, le Dr Daniel Oth, le Dr Peter Tijssen, Anik St-Denis et Yvon Lamontagne pour leur aide et pour le temps qu'ils m'ont consacré.

Je voudrais aussi adresser des remerciements particuliers à Édith qui m'a supporté et encouragé tout au long de ma maîtrise et aussi à mes parents, mon frère et mes soeurs qui n'ont jamais cessé de croire en moi.

Finalement, je remercie la Fondation Armand-Frappier pour le support financier qui m'a permis de poursuivre mes études de maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des tableaux et des figures	vii
Liste des abréviations.....	ix
1. Introduction.....	1
2. Revue bibliographique	3
2.1 Propriétés générales des cellules NK.....	3
2.2 Les récepteurs d'activation des cellules NK.....	6
2.2.1 Le récepteur FcγRIIIA et l'ADCC.....	6
2.2.2 Les récepteurs d'activation non-dépendants des anticorps et des antigènes de classe I du CMH.....	8
2.3 Les récepteurs dont les ligands sont des molécules de classe I du CMH	14
2.3.1 Structure, distribution et polymorphisme des récepteurs Ly49	14
2.3.2 Les ligands des récepteurs Ly49	20
2.3.3 Fonctions inhibitrices associées aux récepteurs Ly49	23
2.3.4 Motif ITIM et transmission du signal d'inhibition	25
2.3.5 Ly49D: un récepteur d'activation se liant à une molécule de classe I du CMH	27
2.3.6 Ly49C: un récepteur à la structure et aux propriétés paradoxales	31
3. Matériel et méthodes.....	38
3.1 Anticorps monoclonaux et antisera.....	38
3.2 Enrichissement des cellules NK.....	39
3.2.1 Méthode de base.....	39
3.2.2 Sélection à l'aide de billes magnétiques	40
3.3 Production des cellules LAK	41
3.4 Analyse cytofluorométrique.....	41
3.5 Stimulation des cellules LAK via le récepteur Ly49C	42
3.5.1 Méthode directe.....	42
3.5.2 Méthode indirecte	43
3.6 Mesure de l'ARN messager de cytokines dans les cellules stimulées.....	44
3.6.1 Préparation des lysats cellulaires	44
3.6.2 Extraction des ARNs totaux.....	45
3.6.3 Mesure des taux d'ARNm spécifiques par RT-PCR quantitatif et compétitif.....	45
3.6.3.1 Choix des amorces spécifiques	46
3.6.3.2 Construction des standards internes.....	48
3.6.3.3 Synthèse des ADNc et amplification	49
3.6.3.4 Électrophorèse en gel d'agarose et analyse.....	50
3.6.4 Mesure des taux d'ARNm spécifiques par buvardage de type Northern.....	51
3.6.4.1 Culture des bactéries	51
3.6.4.2 Purification des plasmides et des inserts plasmidiques.....	53
3.6.4.3 Électrophorèse, transfert et fixation des ARNs.....	53
3.6.4.4 Hybridation	54

3.7 Phosphorylation sur tyrosine des protéines cellulaires	55
3.7.1 Stimulation des cellules	55
3.7.2 Analyse par immunobuvardage ou buvardage de type Western.....	57
3.8 Protéines cytoplasmiques associées aux récepteurs Ly49	58
3.8.1 Expression et purification des protéines de fusion.....	58
3.8.2 Buvardage de type Far Western	60
3.8.3 Immunoprécipitation.....	62
4. Résultats	64
4.1 Rendement de la procédure d'enrichissement des cellules NK et des cultures de cellules LAK.....	64
4.2 Analyse phénotypique des cellules NK utilisées dans le projet et sélection des souches de souris	64
4.3 Activation cellulaire via le récepteur Ly49C	68
4.3.1 Stimulation avec des anticorps solubles.....	69
4.3.2 Stimulation avec des anticorps adsorbés.....	70
4.4 Comparaison de l'effet de l'engagement du récepteur Ly49C avec différents AcM.....	78
4.5 Phosphorylation sur tyrosine des protéines cellulaires	86
4.6 Protéines associées aux récepteurs Ly49	91
4.7 Phosphorylation sur tyrosine des récepteurs Ly49	96
5. Discussion	102
5.1 Analyse phénotypique.....	102
5.2 Activation cellulaire via le récepteur Ly49C	102
5.3 Comparaison du pouvoir activateur de deux AcM anti-Ly49C.....	111
5.4 Phosphorylation sur tyrosine des protéines cytoplasmiques.....	115
5.5 Protéines associées aux récepteurs Ly49	116
5.6 Phosphorylation sur tyrosine des récepteurs Ly49	118
6. Conclusions.....	120
Liste de références	122
Annexe I : Carte génomique du plasmide pGEX-2TK	138
Annexe II : Communications	139

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Tableau I :	Spécificité des différents AcM reconnaissant les molécules de la famille Ly49	17
Figure 1 :	Réprésentation schématique de la structure des récepteurs Ly49	18
Figure 2 :	Hypothèse de l'absence du soi et le modèle des deux récepteurs. Exemple d'une situation impliquant les récepteurs NKR-P1C et Ly49A	28
Tableau II :	Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour l'amplification des ADNc correspondant aux ARNm du TNF- α , de l'IFN- γ et du GM-CSF	47
Figure 3 :	Exemple de quantification des ARNm spécifiques.....	52
Figure 4 :	Phénotype des cellules NK de la souris BALB/c	65
Figure 5 :	Expression des récepteurs NK1.1 et Ly49C sur les cellules NK de la souris hybride CB6 et des lignées parentales correspondantes	67
Figure 6 :	Concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α dans les cellules LAK de souris CB6 stimulées via le récepteur Ly49C	71
Figure 7 :	Concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α dans les cellules LAK de la souris BALB/c stimulées à différentes concentrations cellulaires via le récepteur Ly49C	73
Figure 8 :	Concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α dans les cellules LAK de souris BALB/c stimulée via le récepteur Ly49C en conditions optimisées	75
Figure 9 :	Analyse cinétique de la concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α , à l'IFN- γ et au GM-CSF dans les cellules LAK de souris BALB/c.....	77
Figure 10 :	Concentration intracellulaire des ARNm spécifiques à l'IFN- γ dans les cellules LAK de la souris BALB/c stimulées via le récepteur Ly49C	79

Figure 11 : Comparaison de l'effet de deux AcM anti-Ly49C sur la concentration intracellulaire des ARNm spécifiques à l'IFN- γ dans les cellules LAK de la souris BALB/c stimulées par la méthode indirecte	81
Figure 12 : Analyse par buvardage de type Northern de la concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α et à l'IFN- γ dans les cellules LAK de souris BALB/c stimulées via le récepteur Ly49C.....	82
Figure 13 : Comparaison de l'effet des témoins isotypique IgG3 et 4LO439 et du pouvoir activateur des fragments F(ab') ₂ des AcM anti-Ly49C 4LO3311 et 5GA5.....	85
Figure 14 : Expression du récepteur Ly49C sur les cellules LAK de la souris BALB/c triées sur la base de leur réactivité avec l'AcM 4LO3311.....	87
Figure 15 : Comparaison de l'effet de l'AcM 4LO3311 et du témoin isotypique A.1.9 sur la concentration des ARNm de l'IFN- γ dans les cellules LAK de la souris BALB/c triées sur la base de leur expression du récepteur Ly49C.....	88
Figure 16 : Phosphorylation sur tyrosine des protéines cytoplasmiques dans les cellules LAK de souris BALB/c stimulées avec des AcM biotinylés et de l'avidine	90
Figure 17 : Hybridation avec les protéines de fusion GST-Ly49C et GST-Ly49C p-tyr radiomarquées au ³² P des éluats obtenus après purification par affinité des protéines contenues dans un lysat de cellules RNK-16. (Far Western Blotting)	93
Figure 18 : Immunobuvardage avec les anticorps polyclonaux anti-SHP-1 et anti-SHP-2 des protéines de cellules RNK-16 éluées après purification par affinité sur les différentes protéines de fusion.....	95
Figure 19 : Immunobuvardage avec l'AcM anti-phosphotyrosine 4G10 des protéines Ly49C et Ly49G2 immunoprécipitées à partir de cellules LAK de souris BALB/c.....	97
Figure 20 : Immunobuvardage avec l'AcM 4G10 des protéines Ly49C et Ly49G2 immunoprécipitées avec différents AcM à partir de cellules LAK de souris BALB/c et B6.....	99
Figure 21 : Immunobuvardage avec l'anticorps polyclonal anti-SHP-1 des protéines Ly49C et Ly49G2 immunoprécipitées à partir de cellules LAK de souris BALB/c et B6	101

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcM :	Anticorps Monoclonal
ADCC :	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN :	Acide Déoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATCC :	American Type Culture Collection
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRD :	Carbohydrate Recognition Domain
dNTP :	déoxynucléotide Tri-Phosphate
DTT :	Dithiotréitol
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA :	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGTA :	EthyleneGlycol- β -aminoethyl ether Tetraacetic Acid
EtBr :	Ethidium Bromide
GAH :	Goat Anti-Hamster
GAM :	Goat Anti-Mouse
GAR :	Goat Anti-Rat
GST :	Glutathion-S-Transférerase
h :	heure
HBSS :	Hanks' Balanced Salt Solution
HMK :	Heart Muscle Kinase
HRP :	Horseradish Peroxidase
Ig :	Immunoglobuline
IPTG :	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
ITAM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM :	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
kD :	kilo Dalton
LAK :	Lymphokine Activated Killer

LGL :	Large Granular Lymphocyte
min :	minute
NCBI :	National Center for Biotechnology Information
NK :	Natural Killer
NKC :	NK gene Complex
NKSF :	NK Stimulating Factor
NKT :	NK1.1 ⁺ T cell
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PMA :	Phorbol Myristate Acetate
PTK :	Protéine Tyrosine Kinase
PTP :	Protéine Tyrosine Phosphatase
RT :	Reverse Transcriptase
SAB :	Sérumalbumine Bovine
SA-PE :	Streptavidine-Phycoerythrine
sec :	seconde
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE :	SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SFB :	Sérum Foetal Bovin
TBS :	Tris Buffered Saline
U :	Unité

1. INTRODUCTION

La recherche sur les cellules NK a subi un essor phénoménal au cours des dernières années. Alors que leur activité cytotoxique était considérée comme un artéfact de laboratoire au début des années 70, les données concernant la régulation de cette activité s'accumulent aujourd'hui à un rythme effarant. Ces cellules sont maintenant considérées comme un troisième type de lymphocytes et, bien que la taille de cette population soit relativement modeste, elle semble être très hétérogène, ce qui complique son étude.

Le mode de reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK est maintenant relativement bien compris. La découverte de nombreuses molécules exprimées à la surface des cellules NK et leur implication relative dans la reconnaissance des cellules cibles a mené à l'élaboration de théories sur le fonctionnement de l'activité NK. Cependant, ces théories ne semblent toujours pas pouvoir rendre compte de l'ensemble des observations et, dans ce contexte, les dernières données disponibles sont pour le moins déroutantes. En effet, il a été suggéré que les cellules NK possédaient un « répertoire » de récepteurs d'inhibition ayant pour ligands des molécules de classe I du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et qui seraient responsables de la tolérance aux cellules autologues. Or, il est maintenant clair qu'au moins deux de ces récepteurs (dont un se lie également à une molécule de classe I du CMH) ont plutôt des propriétés activatrices des fonctions cellulaires.

Notre laboratoire a produit, il y a plusieurs années, l'anticorps monoclonal (AcM) 4LO3311 réagissant de façon spécifique avec une sous-population de cellules NK chez plusieurs souches de souris (Lemieux *et al.*, 1991). La molécule reconnue par cet AcM a plus tard été identifiée comme étant le récepteur Ly49C (Gosselin *et al.*, 1997). Les propriétés fonctionnelles attribuées à ce récepteur nous semblaient contradictoires, nous avons entrepris de l'étudier plus à fond. Alors que d'autres avaient associé une fonction inhibitrice à ce récepteur qui appartient d'ailleurs à la famille de molécules dont on suspectait qu'elle formait le répertoire des cellules NK, notre laboratoire avait rapporté

des faits suggérant plutôt l'activation cellulaire suite à l'engagement du récepteur Ly49C par l'AcM 4LO3311 (Morelli et Lemieux, 1993). Cet AcM étant un excellent outil pour l'analyse de ce récepteur, nous avons voulu clarifier ses propriétés fonctionnelles et ainsi fournir des données pouvant aider à la compréhension de la régulation de l'activité cytotoxique et des propriétés sécrétrices des cellules NK exprimant ce récepteur.

Le premier objectif de mon projet de maîtrise était donc d'évaluer la capacité du récepteur Ly49C à activer les fonctions des cellules NK. Pour ce faire, nous avons choisi d'étudier l'effet de l'engagement de ce récepteur par l'AcM 4LO3311 sur l'expression de gènes de cytokines sécrétées par les cellules NK murines. De plus, pour vérifier si la fonction du récepteur pouvait être variable, nous avons voulu comparer l'effet de deux autres AcM reconnaissant des déterminants situés dans un domaine distinct de la portion extracellulaire du récepteur Ly49C.

D'autre part, les propriétés structurales du récepteur de même que les résultats rapportés par d'autres équipes nous ont poussé à vérifier également la capacité du récepteur à inhiber les fonctions des cellules NK. À cet égard, nous avons tenté d'identifier des protéines cytoplasmiques capables de s'associer au récepteur Ly49C. Somme toute, le présent projet se voulait être une caractérisation fonctionnelle du récepteur Ly49C.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Propriétés générales des cellules NK

Les premières publications rapportant l'existence des cellules NK datent du milieu des années 70 et traitent de la capacité qu'ont ces cellules de tuer des cellules tumorales de certaines lignées (Takasugi, Mickey et Terasaki, 1973; Herberman, Nunn et Lavrin, 1975; Kiessling, Klein et Wigzell, 1975). L'étude de cette population cellulaire constitue donc un champ de recherche relativement récent. Les cellules NK ont été décrites à l'origine comme étant de grands lymphocytes granuleux (LGL ou Large Granular Lymphocytes) n'exprimant ni le récepteur des cellules T (TCR) ni le récepteur des cellules B (BCR) et qui sont capables d'exercer une activité cytotoxique non restreinte par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Cette activité est appelée activité cytotoxique naturelle ou encore activité NK. Ces cellules n'expriment pas non plus les protéines du complexe CD3, mis à part la chaîne ζ sur les cellules humaines. C'est sans doute parce qu'elles ont été définies davantage par ce qu'elles n'avaient pas que les cellules NK sont longtemps demeurées dans l'ombre des autres lymphocytes. Elles se caractérisent pourtant par l'expression de la molécule CD56 chez l'humain et des récepteurs Fc γ RIIIA (CD16) et NKR-P1 chez le rat, la souris et l'humain. Outre leur activité cytotoxique naturelle, les cellules NK exercent aussi, via le récepteur CD16, une activité cytotoxique dépendante des anticorps (ADCC, Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) et participent à la régulation des réponses immunitaires par l'intermédiaire des cytokines qu'elles sécrètent, notamment l'interféron gamma (IFN- γ), le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α) et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) (Revu par Trinchieri, 1989).

De distribution ubiquitaire, les cellules NK ont la capacité de réagir rapidement et ainsi de compléter l'action des effecteurs de l'immunité spécifique, le temps que ceux-ci atteignent leur pleine maturité (Gumperz et Parham, 1995). Les cellules NK matures sont très sensibles à l'action de plusieurs cytokines notamment l'IL-2, l'IL-12 (définie à l'origine comme le facteur de stimulation des cellules NK ou NKSF) et les

IFN- α , et β qui, à des degrés divers, stimulent leur prolifération et augmentent leur potentiel lytique et leurs propriétés sécrétrices (revu par Perussia, 1991). Leurs cibles sont essentiellement des cellules tumorales, généralement d'origine hématopoïétique, des cellules infectées par des virus et aussi, dans un contexte moins physiologique, des cellules hématopoïétiques allogéniques ou semiallogéniques.

Pendant longtemps, les mécanismes régissant le déclenchement et la régulation de l'activité NK sont demeurés inconnus. A part le fait que la reconnaissance des cellules cibles était non restreinte par le CMH, que l'activité lytique des cellules NK pouvait s'exercer sans immunisation préalable et que ces cellules ne développaient pas de mémoire immunologique, on ne savait pratiquement rien de leurs propriétés. Il s'écoulera une bonne quinzaine d'années avant que ne soit publiée une première hypothèse sérieuse capable de rendre compte de la somme des observations qui, jusque là, avaient été considérées comme étant plutôt du domaine de la phénoménologie. C'est à Ljunggren et Kärre (1990) qu'il faut attribuer la paternité de l'intéressante « hypothèse de l'absence du soi ». Ces scientifiques n'avaient toutefois pas été les seuls à noter que la sensibilité à la lyse par les cellules NK était fortement augmentée chez les cellules cibles ayant des niveaux réduits de molécules de classe I du CMH. Cette observation les amena à proposer que, contrairement aux lymphocytes T cytotoxiques qui réagissent au non-soi, ce serait plutôt l'absence du soi qui serait le facteur déclenchant de l'activité NK. Telle que formulée, l'hypothèse émise par ces auteurs stipule que les cellules NK sont capables de reconnaître puis de tuer les cellules cibles n'exprimant pas à leur surface l'ensemble des allèles des molécules de classe I du CMH autologue. Ainsi, les cellules NK s'attaqueraient aux cellules cibles dont l'expression des molécules de classe I du CMH est réduite ou aberrante, ce qui est souvent le cas des cellules infectées par des virus ou des cellules ayant subi une transformation néoplasique. Un des intérêts de l'hypothèse proposée est qu'elle rend également compte d'un phénomène connu jusqu'alors sous le terme de résistance hybride. Il s'agit de la capacité des cellules d'un hôte hybride de rejeter les cellules hématopoïétiques parentales, ce qui va à l'encontre des lois classiques de la transplantation. Dans le contexte de l'hypothèse de l'absence du soi, c'est

précisément parce que les cellules du greffon n'expriment pas l'ensemble complet des molécules de classe I du CMH de l'hôte qu'elles seraient rejetées par les cellules NK.

Les corollaires de cette hypothèse sont évidemment que la résistance des cellules autologues à la lyse par les cellules NK dépend de l'expression des molécules de classe I du CMH et que l'activité lytique des cellules NK est tenue en échec sur la base de leur reconnaissance selon un mode classique d'interaction récepteur-ligand. La recherche de récepteurs pour les molécules de classe I du CMH à la surface des cellules NK a ouvert un champ de recherche extrêmement fructueux. Nous en relaterons les étapes clés dans les prochaines sections. Cependant, il a aussi été rapporté que malgré l'absence de molécules de classe I du CMH à leur surface, les cellules de certaines lignées demeuraient résistantes à l'activité NK. Cette observation a amené Yokoyama (1993) à proposer le modèle des deux récepteurs qui stipule que l'activité NK est régie par l'action de récepteurs antagonistes. Suite à leur engagement par un ligand approprié, les récepteurs d'activation seraient capables d'enclencher la dégranulation des cellules NK et conséquemment la lyse des cellules cibles. Par contre, des récepteurs d'inhibition ayant pour ligands les molécules de classe I du CMH pourraient transmettre un signal négatif à la cellule NK et interrompre la transduction du signal engendré par l'engagement des récepteurs d'activation. En d'autres termes, les cellules NK seraient prêtes à tuer à tout moment n'importe quelles cellules avec lesquelles elles entrent en contact. Le sort d'une cellule cible donnée dépendrait par ailleurs de la présence à sa surface de ligands pour les récepteurs d'activation et d'inhibition. La réduction ou la perte de l'expression des molécules de classe I du CMH la rendrait particulièrement vulnérable à la lyse par les cellules NK mais la perte concurrente des ligands des récepteurs d'activation pourrait la sauver. Nous verrons dans la prochaine section que cette dernière situation est toutefois peu commune étant donné la diversité des récepteurs d'activation. En outre, si le rôle joué par les molécules de classe I du CMH ne fait plus de doute, la nature des signaux transmis suite à leur interaction avec des récepteurs présents sur les cellules NK est plus variée qu'il n'avait été anticipé. Nous en discuterons à la section 2.3.

2.2 Les récepteurs d'activation des cellules NK

2.2.1 Le récepteur Fc γ RIIIA et l'ADCC

Nous avons mentionné précédemment que les cellules NK étaient capables de lyser des cellules cibles recouvertes d'anticorps, une propriété appelée ADCC. Le récepteur Fc γ RIIIA (CD16) via lequel cette activité est initiée est en fait le seul récepteur d'immunoglobulines (Ig) présent à la surface des cellules NK (Ravetch et Kinet, 1991). Au plan fonctionnel, CD16 est en fait un complexe multimérique composé d'une chaîne α transmembranaire, responsable de la liaison au ligand, soit la portion Fc des IgG, associée de façon noncovalente aux homo ou hétérodimères formés par les chaînes ζ du CD3/TCR (chez l'humain) et γ du récepteur Fc ϵ RI (revu par Rochet, Anderson et Vivier, 1992). Les chaînes ζ ou γ sont essentielles à l'expression et au fonctionnement de CD16: en effet, la chaîne α étant une glycoprotéine de la superfamille des immunoglobulines ne possédant qu'un court segment intracytoplasmique, elle ne peut transmettre à elle seule de signal à la cellule qui l'exprime (Ravetch et Kinet, 1991; Hulett et Hogarth, 1994). Ce sont les chaînes ζ ou γ qui lui sont associées qui sont responsables de cette fonction. Celles-ci possèdent dans leur segment intracytoplasmique une séquence consensus communément appelée Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ou ITAM (Reth, 1989; Cambier, 1995). Suite à l'engagement du récepteur par son ligand (IgG) à la surface d'une cellule recouverte d'anticorps ou par un anticorps monoclonal (AcM) anti-CD16 adsorbé sur un support approprié, il y a phosphorylation transitoire de ce motif. Ceci permet le recrutement de protéines contenant des domaines SH2 (src homology domain 2) qui par leur propriété de liaison aux phosphotyrosines assureront la transduction du signal à partir du récepteur membranaire.

Une des premières étapes de la cascade d'évènements biochimiques initiée par l'engagement de CD16 dans les conditions décrites précédemment est l'activation des protéines tyrosine kinases (PTK) qui entraîne la phosphorylation de tyrosines de plusieurs protéines, notamment celle des chaînes ζ ou γ au niveau des ITAMs (Vivier *et al.*, 1991). La PTK lck appartenant à la famille Src, de même que les PTK syk et ZAP-70

appartenant à la famille Syk peuvent participer à cette cascade, syk étant vraisemblablement la seule PTK qui soit absolument essentielle à la transmission d'un signal à partir de CD16 (revu par Leibson, 1997). Parmi les substrats importants qui sont phosphorylés par les PTK activées après l'engagement de CD16 sur les cellules NK, il faut mentionner la PI3K (Kanakaraj *et al.*, 1994) et les phospholipases $C\gamma 1$ et $C\gamma 2$ (Liao, Shin et Rhee, 1993) qui vont alors hydrolyser le phosphoinositol 4,5-diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 2,4,5-triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). Les métabolites ainsi générés induisent respectivement l'augmentation de la concentration intracellulaire des ions Ca^{++} et l'activation de protéines kinases C (PKC) (Cassatella *et al.*, 1989; Leibson *et al.*, 1990). L'activation de la PI3K et l'augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{++} sont absolument requises pour la manifestation subséquente de l'ADCC mais l'activation des PKC ne semble pas y être essentielle puisque l'induction de l'exocytose granulaire et de l'ADCC via l'engagement de CD16 n'est pas affectée en présence d'un inhibiteur de PKC (Bonnema *et al.*, 1994; Leibson, 1997). Les conséquences tardives de l'engagement du récepteur CD16 des cellules NK sont nombreuses: en plus de l'exocytose granulaire et la lyse de cellules cibles recouvertes d'anticorps, l'augmentation de la transcription et de la traduction de gènes codant des protéines membranaires (CD25, CD69, VLA-6, le ligand de Fas) et des cytokines (TNF- α , IFN- γ et GM-CSF) de même que l'apoptose des cellules activées ont aussi été rapportées (revu par Daëron, 1997; Perussia, 1998; Sanchez-Mejorada et Rosales, 1998).

Alors que plusieurs AcM contre le CD16 humain sont disponibles, seul l'AcM 2.4G2 réagit avec le Fc γ RIIIA murin (Unkeless 1979; Perussia, 1998). De plus, contrairement aux cellules NK humaines, aucune lignée cellulaire dérivée de cellules NK n'est disponibles chez la souris et il n'est donc pas étonnant que la majorité des connaissances disponibles concernant la nature des signaux transmis suite à l'engagement de CD16 proviennent d'études effectuées chez l'humain. Même si on ne peut directement en extrapoler la portée dans le modèle murin, il est vraisemblable que les cellules NK des deux espèces fonctionnent de façon similaire puisqu'elles expriment les mêmes molécules de signalisation et utilisent essentiellement les mêmes voies de transduction.

Chez la souris, la spécificité de liaison du récepteur FcγRIIIA aux immunoglobulines de différents isotypes a initialement été établie comme suit par Ravetch et Kinet (1991): IgG2b > IgG2a > IgG1 >> IgG3. Plus récemment, les travaux de Gavin *et al.* (1998) ont par ailleurs clairement démontré que chez la souris, seul le récepteur de haute affinité FcγRI est capable de lier les IgG3. Cette observation élimine donc la possibilité que l'activité ADCC puisse être amorcée via un AcM de souris de type IgG3. Cette précision est importante dans le contexte du travail expérimental ayant donné lieu à ce mémoire.

2.2.2 Les récepteurs d'activation non-dépendants des anticorps et des antigènes de classe I du CMH

Si les voies de transduction activées via le récepteur CD16 sont relativement bien comprises, l'identification des récepteurs responsables de l'activation de la cytotoxicité naturelle et les voies de transduction impliquées suite à leur engagement ne sont que partiellement élucidées. En effet, il n'a toujours pas été possible d'identifier un récepteur unique qui soit responsable de cette fonction. On reconnaît généralement aujourd'hui que les récepteurs d'activation des cellules NK sont variés, non spécifiques à cette population cellulaire et que plusieurs se comportent en fait comme des molécules de co-activation (revu par Lanier, 1998). C'est le cas par exemple des molécules CD2, CD28, CD44 et CD69 auxquelles s'ajoutent d'autres récepteurs qui suscitent beaucoup d'intérêt, notamment NKR-P1, 2B4 et NKp46. Tous ces récepteurs ont en commun que des molécules homologues sont présentes chez l'humain et chez les rongeurs, que leurs ligands ne sont pas des molécules du CMH et qu'ils peuvent induire la lyse de cellules cibles dans un contexte indépendant des anticorps. Vu leur importance et l'intérêt de l'information qu'ils ont contribué à générer, nous exposerons de manière plus détaillée l'activation via les récepteurs NKR-P1, 2B4 et NKp46.

Le récepteur NKR-P1 (CD161) est certainement le mieux caractérisé de tous. Ce récepteur appartient à une famille de molécules dont le premier membre appelé NKR-P1A a été identifié chez le rat (Chambers *et al.*, 1989). Jusqu'à présent, trois gènes

codant des molécules homologues (NKR-P1A, B et C) ont été décelés chez le rat et la souris (Giorda *et al.*, 1990; Yokoyama *et al.*, 1991; Giorda et Trucco, 1991) mais seul le gène NKR-P1A a été trouvé chez l'humain (Lanier, Chang et Phillips, 1994). Les récepteurs NKR-P1 sont des protéines transmembranaires de type II (extrémité aminoterminal intracellulaire) apparentées aux molécules de la superfamille des lectines de type C (dépendantes du Ca^{++}) (Giorda *et al.*, 1990; Giorda et Trucco, 1991). Les gènes codant ces molécules sont regroupés dans une région chromosomique désignée « Complexe des gènes NK » (NKC) (Yokoyama *et al.*, 1991), en amont d'une autre famille multigénique appelée Ly49 sur laquelle nous reviendrons ultérieurement.

C'est grâce à l'ACM 3.2.3 que les propriétés activatrices du récepteur NKR-P1 de rat ont pu être mises en évidence (Chambers *et al.*, 1989). En présence de cet anticorps, les cellules LAK de rat acquièrent en effet la capacité de lyser des cellules cibles exprimant des Fc γ R. Ce phénomène est appelée ADCC inverse ou lyse redirigée. L'AcM 3.2.3 adsorbé dans les puits d'une microplaque a également la capacité de provoquer la dégranulation des cellules LAK, une autre manifestation de l'activation du programme lytique. Cependant, cette propriété constitue un événement tardif de l'activation. Au nombre des événements plus précoces, il a été rapporté que l'activation des cellules NK de la lignée de rat RNK-16 (Reynolds *et al.*, 1984) avec des fragments F(ab')₂ solubles de l'AcM 3.2.3 induit l'hydrolyse des phosphoinositides et augmente la concentration intracellulaire des ions Ca^{++} (Chambers *et al.*, 1989), cette dernière manifestation ayant aussi été notée dans des cellules spléniques nonadhérentes de rat stimulées par l'IL-2 (Ryan *et al.*, 1992). Les niveaux atteints sont plus élevés en présence de fragments F(ab')₂ d'un anticorps secondaire agissant comme agent de pontage des récepteurs membranaires (cross-linking). L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{++} de même que la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs substrats via l'engagement de NKR-P1 sont dépendantes de CD45 puisque ces phénomènes ne sont pas induits dans des mutants RNK-16 déficients en CD45 (Bell, Dethloff et Imboden, 1993). La PTK lck pourrait être impliquée dans les faits observés puisqu'une séquence permettant sa liaison (CXCP) est présente dans la portion cytoplasmique de NKR-P1 et qu'en outre, elle co-immunoprécipite avec NKR-P1 (Campbell et Giorda, 1997). Cette interaction est

toutefois beaucoup plus faible que celle observée avec CD8 α et CD4 dans les lymphocytes T suggérant que le seuil d'activation via NKR-P1 soit plus élevé. Enfin, il a été rapporté récemment que la stimulation des LAK de rat via NKR-P1A provoque dès les premières minutes la liaison du récepteur à des protéines G hétérotrimériques (Al-Aoukaty, Rolstad et Maghazachi, 1997). Les conséquences de cette liaison restent toutefois à élucider.

Chez la souris, le récepteur NKR-P1 le mieux caractérisé est celui codé par le gène *nkrp1c*. Ce récepteur est en fait la protéine NK1.1, une molécule reconnue par l'AcM PK136 (Koo et Peppard, 1984) et qui, chez les souches de souris qui l'expriment, est présente à la surface de la majorité des cellules NK et d'une petite sous-population de lymphocytes T (NKT) (Ryan et Seaman, 1997; Vicari et Zlotnik, 1996). Dans un système analogue à celui utilisé par Chambers *et al.* (1989) il a été démontré qu'en présence de l'AcM PK136, il y avait augmentation de la capacité de lyse des cellules NK et LAK de souris NK1.1⁺ envers différentes cellules cibles exprimant des Fc γ R (Karlhofer et Yokoyama, 1991). Des études ultérieures ont permis d'établir que l'AcM PK136 pouvait aussi induire la prolifération de cellules NK purifiées (Reichlin et Yokoyama, 1998), ainsi que la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et de GM-CSF (Arase, Arase et Saito 1996; Kim et Yokoyama, 1998). En utilisant des souris B6 déficientes pour l'expression du gène γ ($\gamma^{-/-}$), Arase *et al.* (1997) ont établi que la production d'IFN- γ par les cellules NK ou les NKT stimulées via NK1.1 était dépendante d'une association avec la chaîne γ de Fc ϵ RI comme c'est le cas pour l'activation via le récepteur Fc γ RIIIA. *In vivo*, l'inoculation de l'AcM PK136 entraîne rapidement la disparition par apoptose de certaines sous-populations de cellules NK mais induit par ailleurs la production d'IL-4 par les cellules NKT (Asea et Stein-Streilein, 1998). Cette observation non seulement démontre l'importance fonctionnelle du récepteur NK1.1 mais elle souligne que les conséquences de son engagement sont étroitement liées à d'autres facteurs dont l'identité reste à établir.

La sélection d'un mutant déficient en NKR-P1 à partir de la lignée RNK-16 a permis d'établir que NKR-P1 n'est en fait qu'un récepteur d'activation parmi d'autres puisque la plupart des cellules cibles, dont la lignée prototype YAC-1, sont lysées aussi

efficacement par la lignée mutante que par la lignée d'origine (Ryan et Seaman, 1997). Le rôle de NKR-P1 comme récepteur d'activation n'est toutefois pas pour autant mis en doute puisque la transfection de l'ADNc de NKR-P1A dans le mutant restaure sa capacité lytique envers certaines cellules cibles résistantes au mutant mais non à la lignée RNK-16 d'origine. En outre, puisque l'addition de l'AcM PK136 dans un test de cytotoxicité *in vitro* empêche la lyse des lymphoblastes parentaux par des cellules NK de souris hybrides issues du croisement B6 x BALB/c, NK1.1 jouerait aussi un rôle dans l'activation de la lyse par les ligands exprimés sur les lymphoblastes (Kung et Miller, 1995). Malgré toutes ces observations qui identifient NKR-P1 comme un récepteur d'activation, son rôle précis en situation physiologique est encore méconnu. Bien que des liaisons à des résidus polysaccharidiques aient été rapportées (Bezouska *et al.*, 1994a et b), les molécules porteuses de ces structures n'ont toujours pas été identifiées. Il faut aussi noter que la distribution de ce récepteur n'est pas exclusive aux cellules NK et NKT. On a rapporté sa présence sur les neutrophiles polynucléaires du rat (Chambers *et al.*, 1989) mais non sur ceux de la souris (Gosselin, Lusignan et Lemieux, 1993), sur les monocytes de rat (Scriba *et al.*, 1997) de même que sur les monocytes et les cellules dendritiques humaines (Poggi *et al.*, 1997). L'engagement du NKR-P1A humain entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{++} et la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-12 par ces deux derniers types de cellules (Poggi *et al.*, 1997). Contrairement à ce qui est observé chez les rongeurs, le récepteur NKR-P1A n'est exprimé que sur une sous-population des cellules NK humaines et sur une proportion importante des lymphocytes T (Lanier, Chang et Phillips, 1994). Malgré les homologies de structure avec le NKR-P1A de rat et le NKR-P1C de souris, l'engagement du récepteur NKR-P1A humain n'active pas la lyse par des clones de cellules NK et même, dans certains cas, l'inhibe. Ainsi, il a été rapporté récemment que l'expression du NKR-P1A humain est modulé par l'IL-12 mais non par l'IL-2 et que l'augmentation de son expression se traduit par l'inhibition de la cytotoxicité initiée via d'autres récepteurs (Poggi *et al.*, 1998). Des données encore plus récentes démontrent que le récepteur NKR-P1B murin possède également des propriétés inhibitrices (Kung *et al.*, 1999; Carlyle *et al.*, 1999). Dans ce dernier cas, cette observation est toutefois en accord avec la structure prédite en acides aminés de la portion cytoplasmique du récepteur (Ryan et Seaman, 1997).

L'identification du récepteur 2B4 murin et le clonage de son ADNc remontent à 1993 (Garni-Wagner *et al.*, 1993; Mathew *et al.*, 1993). Plusieurs transcrits de 2B4 ont été identifiés par buvardage de type Northern suggérant que ceux-ci soient des produits d'épissage alternatif (Mathew *et al.*, 1993). La molécule 2B4, qui appartient à la superfamille des immunoglobulines, a comme ligand CD48, une protéine qui se lie aussi à CD2 et qui appartient par ailleurs à la même sous-famille que 2B4, CD2, CD58, Ly-9 et une autre protéine nommée SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule) (Latchman, McKay et Reiser, 1998; Brown *et al.*, 1998). À l'instar des récepteurs NKR-P1A de rat et NKR-P1C de souris, l'engagement du récepteur 2B4 murin induit l'exocytose granulaire, augmente la lyse des cellules cibles et entraîne la sécrétion de cytokines (Garni-Wagner *et al.*, 1993). Contrairement à son homologue murin, le récepteur 2B4 humain est exprimé non seulement sur les cellules NK et une sous-population de cellules T douées d'activité cytotoxique non-restreinte par le CMH, mais il est aussi présent sur les monocytes et les basophiles (Nakajima *et al.*, 1999). Toutefois, l'engagement de 2B4 par un anticorps ou son ligand CD48 active la cytotoxicité des cellules NK humaines mais n'induirait pas l'activation des cellules T et des monocytes. Il a été rapporté récemment que le récepteur 2B4 humain phosphorylé sur tyrosine se lie spécifiquement à la protéine tyrosine phosphatase (PTP) SHP-2 mais interagit aussi avec la protéine adaptatrice SAP dont l'interaction avec SLAM est déjà connue (Tangye *et al.*, 1999). Ainsi qu'il avait été noté pour SLAM (Sayos *et al.*, 1998), SAP compétitionne avec SHP-2 pour l'interaction avec 2B4 (Tangye *et al.*, 1999). SAP et SHP-2 ayant des fonctions différentes, la régulation des signaux via 2B4 semble passablement complexe et n'est pas encore bien comprise. Chez la souris, une isoforme de 2B4 ayant des propriétés inhibitrices a récemment été rapporté (Schatzle *et al.*, 1999). Celle-ci et non l'isoforme activatrice se lie à SHP-2. On ne sait pour l'instant s'il existe aussi chez l'humain des isoformes aux propriétés différentes.

Le dernier récepteur d'activation des cellules NK dont nous discuterons dans cette section est de découverte plus récente. Il s'agit de Nkp46, une protéine de 46 kD faisant aussi partie de la superfamille des immunoglobulines (Pessino *et al.*, 1998). Son premier intérêt est que, contrairement aux autres récepteurs mentionnés jusqu'ici, il s'agit d'une

molécule qui serait exprimée uniquement sur les cellules NK fraîches ou activées (Sivori *et al.*, 1997; Pessino *et al.*, 1998). On ne connaît pas encore le ligand de ce récepteur mais son engagement à l'aide d'un AcM dans les conditions appropriées entraîne l'augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{++} , la lyse de cibles non protégées par des ligands de récepteurs d'inhibition et la production de cytokines (Sivori *et al.*, 1997). La structure prédite en acides aminés de la protéine NKp46 révèle que sa portion cytoplasmique ne possède pas d'ITAM et que sa portion transmembranaire contient un acide aminé chargé qui pourrait intervenir dans la formation d'un complexe avec une protéine adaptatrice telle la chaîne ζ du CD3 (Pessino *et al.*, 1998). En comparant l'activité de différents clones de cellules NK humaines, on a pu observer que les propriétés activatrices de ce récepteur sont dépendantes de son niveau d'expression (Sivori *et al.*, 1999). Un homologue murin de NKp46 a récemment été identifié et sa structure prédite en acides aminés laisse présager qu'il aura les mêmes caractéristiques structurales que celles du récepteur humain (Biassoni *et al.*, 1999).

En conclusion, les récepteurs intervenant dans l'activation des cellules NK sont aussi nombreux que variés. La transduction des signaux générés par leur engagement suit des voies déjà bien caractérisées dans d'autres lymphocytes. De façon générale, il faut retenir que l'activation de l'ADCC via le récepteur Fc γ RIIIA dépend de l'activation de la PI3K mais ne semble pas dépendre de l'activation des PKC et que c'est l'inverse pour l'activation de la cytotoxicité naturelle, à tout le moins via certains récepteurs (revu par Leibson, 1997). L'engagement de tous ceux dont nous avons fait mention jusqu'à maintenant est indépendant des molécules du CMH. Pourtant, contrairement à ce qui pouvait paraître un dogme lors de la découverte des cellules NK qui furent d'ailleurs qualifiées à l'origine de cellules cytotoxiques non-restreintes par le CMH, des récepteurs dont les ligands sont des molécules de classe I du CMH sont présents sur les cellules NK. Leur description fait l'objet de la prochaine section.

2.3 Les récepteurs dont les ligands sont des molécules de classe I du CMH

L'hypothèse du contrôle de l'activité fonctionnelle des cellules NK par deux types de récepteurs aux propriétés antagonistes avait déjà de solides assises au moment où elle fut émise par Yokoyama en 1993. Son équipe avait en effet préalablement démontré dans un article fort convaincant qu'un récepteur appelé Ly49 et exprimé sur une petite sous-population de cellules NK de la souris inhibait la lyse des cellules cibles lors de son interaction avec la molécule H-2D^d (Karlhofer, Ribaud et Yokoyama, 1992). Nous verrons dans les prochaines sections que le gène qui code ce récepteur appartient de fait à une famille multigénique et multiallélique dont la croissance a été très importante au cours des dernières années. De nombreux récepteurs réagissant avec les antigènes HLA ont parallèlement été identifiés. Il serait inapproprié d'en dresser ici une liste exhaustive. Moretta *et al.* (1999) ont récemment publié à leur propos une excellente revue à laquelle le lecteur est invité à référer au besoin. Nous allons plutôt nous concentrer sur les récepteurs de la famille Ly49 dont l'un des membres est précisément l'objet de ce mémoire.

2.3.1 Structure, distribution et polymorphisme des récepteurs Ly49

Les molécules Ly49 constituent une famille de récepteurs initialement identifiés chez la souris. Curieusement, le premier récepteur découvert, d'abord appelé Ly49 et maintenant désigné comme Ly49A, a d'abord été trouvé à la surface de lymphocytes T (Chan et Takei, 1989; Yokoyama *et al.*, 1989). Peu de temps après, la présence de Ly49A sur une sous-population de cellules NK a été établie et le gène codant cette protéine a été localisé dans le NKC, à proximité de la famille des gènes NKR-P1 (Yokoyama *et al.*, 1990). En isolant de nouvelles séquences à partir d'une banque d'ADNc de poumons de souris, l'équipe du Dr Takei (Terry Fox Laboratory, Vancouver, BC, Canada) a pu élargir la famille de gènes Ly49 en y ajoutant les séquences codant les récepteurs Ly49B et Ly49C (Wong *et al.*, 1991). Les séquences codant les récepteurs Ly49D, Ly49E et Ly49F ont été rapportées par Smith *et al.* (1994) en plus des séquences des récepteurs Ly49G1, G2 et G3, ces dernières étant vraisemblablement le fruit d'un épissage alternatif. Un

papier soumis à la même période que le précédent identifiait lui aussi deux nouvelles séquences logiquement nommées Ly49D et Ly49E (Brennan *et al.*, 1994). Cependant, considérant la présence de l'article de Smith *et al.* (1994), la désignation de celles-ci a dû être modifiée: l'une est différente de toutes celles connues et devient donc Ly49H alors que l'autre fait partie du sous-groupe Ly49G identifié par Smith, Karlhofer et Yokoyama (1994) et devient Ly49G4. Une collaboration de notre équipe avec celle du Dr Takei a récemment permis d'identifier et de séquencer l'ADNc d'un récepteur très apparenté à Ly49C soit Ly49I (Brennan *et al.*, 1996a). Enfin, cinq nouvelles séquences viennent d'être publiées et correspondraient aux récepteurs Ly49J à Ly49N (McQueen *et al.*, 1998). Bien que ces séquences soient incomplètes, elles pourraient représenter cinq nouveaux gènes fonctionnels puisqu'elles ne contiennent pas de codons stop ni de changements de cadres de lecture. Les gènes *Ly49j*, *k* et *n* présentent une grande homologie avec le gène *Ly49c*, à tout le moins dans un exon codant une partie de la portion extracellulaire. En incluant *Ly49i*, dont nous avons déjà souligné la parenté avec Ly49C, et Ly49H, dont la portion extracellulaire a 90% d'homologie avec Ly49C (Brennan *et al.*, 1994), on compterait donc cinq gènes codant des molécules "Ly49C-like" (McQueen *et al.*, 1998). Tous les gènes *Ly49* à l'exception de *Ly49b* sont situés dans le NKC, dans la partie distale du chromosome 6 chez la souris (Yokoyama et Seaman, 1993; Brown *et al.*, 1997). Trois gènes homologues aux Ly49 murins ont été identifiés chez le rat (Dissen *et al.*, 1996) et un autre chez l'humain (Westgaard *et al.*, 1998); ceux-ci sont localisés dans les zones NKC des chromosomes apparentés. Cependant, leur fonction à la surface des cellules NK est encore peu documentée.

Parmi les 14 membres de la famille Ly49 murine, seulement quatre récepteurs ont pu être étudiés dans un contexte physiologique. Seuls des AcM réagissant avec les récepteurs Ly49A, Ly49C, Ly-49D et Ly49G2 sont présentement disponibles. Quatre AcM réagissent avec Ly49A: YE1/32, YE1/48 (Chan et Takei, 1986) et JR9-318 (Roland et Cazenave, 1992) reconnaissent des déterminants des récepteurs Ly49A des souris B6 et BALB/c alors que A1 (Nagasawa *et al.*, 1987) ne reconnaît que l'allèle de B6. Trois AcM réagissent avec Ly49C soit SW5E6 (Sentman *et al.*, 1989), 4LO3311 (Lemieux *et al.*, 1991; Gosselin *et al.*, 1997) et 5GA5 (Depatie *et al.*, 1999). Alors que 4LO3311 reconnaît

les allèles de B6 et BALB/c de Ly49C et ne réagit avec aucune autre cellule transfectée avec les ADNc des récepteurs Ly49A à I (Brennan *et al.*, 1996a; Gosselin *et al.*, 1997), les anticorps SW5E6 et 5GA5 reconnaissent des déterminants communs aux récepteurs Ly49C et I (Brennan *et al.*, 1996a; Depatie *et al.*, 1999). Le récepteur Ly49C correspond à la molécule préalablement identifiée sous le nom d'antigène NK2.1 (Gosselin *et al.*, 1997). Trois AcM reconnaissent le récepteur Ly49D soit: 12A8, dont le déterminant est aussi présent dans Ly49A (Mason *et al.*, 1996), 4E5 qui réagirait sélectivement avec Ly49D (McVicar *et al.*, 1998) et 4E4 qui a permis d'identifier que le produit du gène *Chok* était Ly49D (Idris *et al.*, 1999). Pour le récepteur Ly49G2, on dispose aussi de deux réactifs soit: l'AcM 4D11 produit contre l'antigène LGL-1 (Mason *et al.*, 1988) dont l'identité avec Ly49G2 a ultérieurement été établie (Mason *et al.*, 1995) et 4LO439 qui réagit exclusivement avec l'allèle de B6 de Ly49G2 (Lemieux *et al.*, 1991; Depatie *et al.*, 1999). A l'instar des AcM SW5E6, 5GA5, et 12A8, l'AcM 4D11 réagit avec un déterminant commun à deux récepteurs soit Ly49G2 et Ly49A (Takei, Brennan et Mager, 1997; Salcedo *et al.*, 1997). Un sommaire des spécificités de ces anticorps est présenté dans le Tableau I.

De même que les récepteurs NKR-P1, les récepteurs Ly49 sont des protéines transmembranaires de type II apparentées aux molécules de la superfamille des lectines de type C (revu par Takei, Brennan et Mager, 1997). Ces protéines sont composées d'un segment cytoplasmique de 44 a.a., d'une portion transmembranaire et d'une tige reliant à la membrane un domaine de liaison à des oligosaccharides appelé CRD (Carbohydrate Recognition Domain). Au niveau génomique, trois exons différents codent respectivement les portions intracytoplasmique et transmembranaire ainsi que la tige alors que le CRD est codé par trois autres autres exons (Wong *et al.*, 1991; Kubo *et al.*, 1993). La structure schématique d'un récepteur Ly49 est illustrée à la Figure 1.

Les récepteurs Ly49 ayant pu être étudiés jusqu'à maintenant sont des protéines fortement glycosylées, exprimées en surface cellulaire sous forme d'homodimères reliés

Récepteur	AcM	isotype	A1	YE1/32	YE1/48	JR9-318	SW5E6	4LO3311	5GA5	12A8	4E5	4D11	4LO439
			souris IgG2a	rat IgG2a	rat IgG2b	souris IgG1	souris IgG2a	souris IgG3	Hamster IgG	rat IgG2a	rat IgG2a	rat IgG2a	souris IgG3
Ly49A	BALB/c			X	X	X							X
	B6	X	X	X	X					X		X	
Ly49C	BALB/c						X	X	X				
	B6						X	X	X				
Ly49D	B6									X	X		
Ly49G2	BALB/c											X	
	B6											X	X
Ly49I	B6						X		X				

Tableau I. Spécificité des différents AcM reconnaissant les molécules de la famille Ly49.

Seuls des AcM dirigés contre les récepteurs Ly49A, Ly49C, Ly49D, Ly49G2 et Ly49I sont présentement disponibles. Parmi ceux-ci, plusieurs réagissent avec plus d'un récepteur Ly49, c'est le cas des AcM SW5E6, 5GA5, 12A8 et 4D11. Les AcM YE1/32, YE1/48, JR9-318 et 4LO3311 réagissent avec un seul récepteur mais reconnaissent les allèles exprimés par la souris BALB/c et par la souris B6. Finalement, les AcM A1, 4E5 et 4LO439 réagissent spécifiquement avec un seul allèle Ly49. L'isotype de chacun de ces AcM est indiqué.

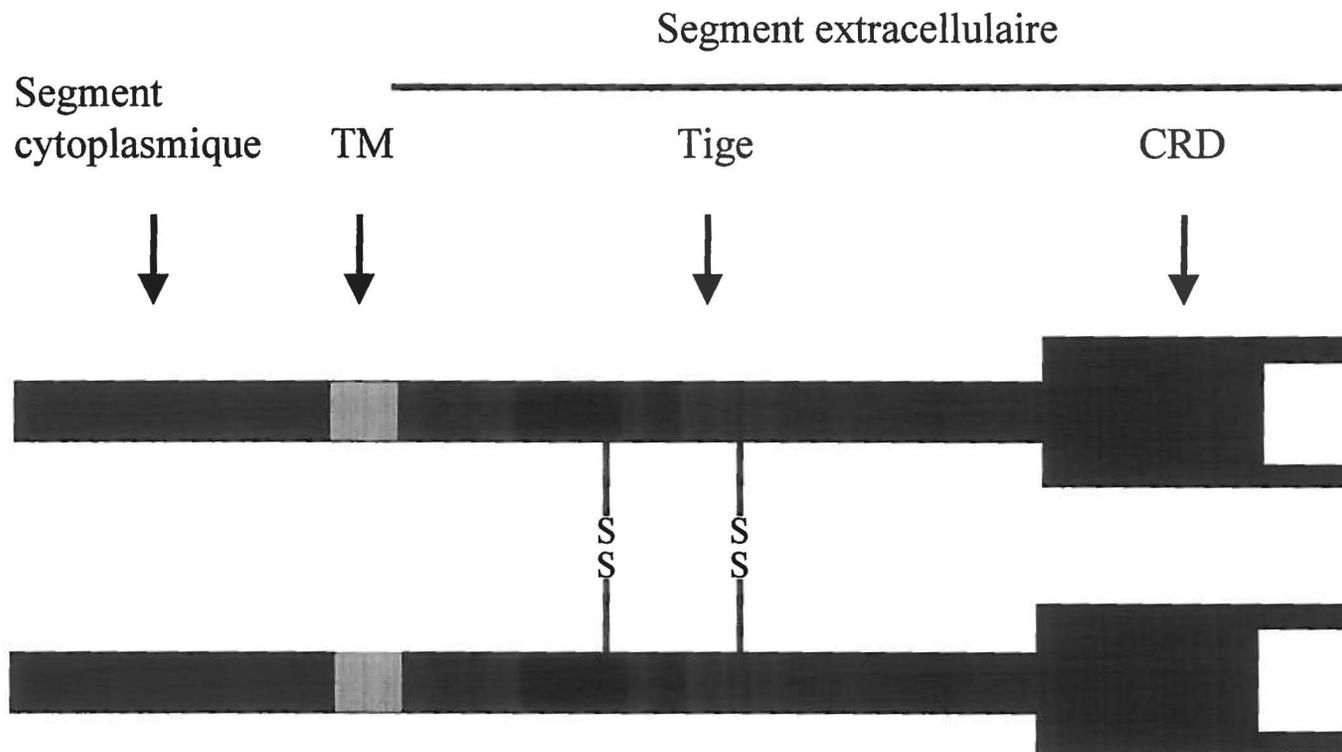


Figure 1. Représentation schématique de la structure des récepteurs Ly49

Les deux chaînes formant les homodimères Ly49 sont reliées par des ponts disulfures (SS). Chacune de ces chaînes comprend une portion cytoplasmique, une portion transmembranaire (TM) et une tige reliant cette dernière au domaine de reconnaissance des sucres (CRD).

par des ponts disulfures. En conditions réductrices, leur masse moléculaire varie de 40 à 65 kD (Chan et Takei, 1989; Gosselin, Lusignan et Lemieux, 1993; Mason *et al.*, 1995; Stoneman *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1996). Certaines molécules de la famille Ly49 ont des propriétés structurales directement reliées à leur fonction. Ainsi plusieurs récepteurs Ly49 possèdent, dans leur portion cytoplasmique, une série d'acides aminés formant un motif particulier qui est impliqué dans la transmission d'un signal suite à l'engagement de ces récepteurs. Par contre, d'autres récepteurs de cette même famille ne possèdent pas ce motif mais ont plutôt un acide aminé chargé dans leur portion transmembranaire et il semble que ce dernier soit également impliqué dans la transmission d'un signal à partir de ce deuxième type de récepteurs. Nous reviendrons sur ces deux caractéristiques structurales particulières dans les prochaines sections.

Les différents récepteurs Ly49 sont exprimés à la surface de sous-populations de cellules NK qui se chevauchent partiellement (Brennan *et al.*, 1994; Held *et al.*, 1996; Kubota *et al.*, 1999). A l'aide des AcM A1 (anti-Ly49A), 4LO3311 (anti-Ly49C), 5GA5 (anti-Ly49C/I), 4LO439 (anti-Ly49G2) et PK136 (anti-NK1.1) notre laboratoire a récemment pu établir que, chez la souris B6, les cellules NK1.1⁺ qui expriment l'un et/ou l'autre des quatre récepteurs Ly49 reconnus par ces AcM représentent globalement 85% des cellules NK1.1 (Depatie *et al.*, 1999). Dans une étude phénotypique élaborée impliquant la recherche d'ARNm de dix des récepteurs Ly49 dans des cellules NK individuelles, Kubota *et al.*, (1999) rapportent que 56 des 62 cellules qu'ils ont analysées, soit 90%, expriment au moins un de ces quatre récepteurs. La taille relative des sous-populations de cellules NK exprimant l'un ou l'autre de ces récepteurs de même que leur densité en surface cellulaire varient beaucoup selon les souches de souris (Karlhofer *et al.*, 1994; Brennan *et al.*, 1994; Olsson, Kärre et Sentman, 1995; Mason *et al.*, 1996; Gosselin *et al.*, 1997). Ces observations pourront éventuellement aussi s'appliquer aux cellules NKT qui expriment des récepteurs Ly49 mais cette question n'a pas encore été abordée.

Eu égard à l'expression des récepteurs Ly49, les cellules NK constituent une population assez hétérogène. En plus des variations dont nous venons de faire mention en

ce qui a trait au niveau d'expression d'un récepteur donné et à la taille de la population qu'il identifie, l'expression aléatoire de chacun des gènes (Held and Kunz, 1998), leur multiplicité (Takei, Brennan et Mager, 1997; McQueen *et al.*, 1998), le polymorphisme allélique observé pour certains d'entre eux dont Ly49A, Ly49C, Ly49G2 et Ly49I (Held, Roland et Raulet, 1995; Mason *et al.*, 1995; Brennan *et al.*, 1996a) et l'épissage alternatif auquel d'autres sont exposés notamment Ly49G, Ly49D et Ly49H (Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994; Silver, Elliott et Kane, 1996) sont autant de faits qui contribuent à la diversité des cellules NK. Cependant, des études effectuées avec des souris hybrides ont permis de noter une certaine exclusion allélique dans l'expression des gènes Ly49A (Held, Roland et Raulet, 1995; Held et Raulet, 1997), Ly49C et Ly49G2 (Held et Kuntz, 1998). Suite à la découverte de l'interaction entre le récepteur Ly49A et la molécule H-2D^d, il était bien sûr tentant de poser l'hypothèse que ce pourrait bien être les récepteurs Ly49 qui définissent le répertoire des cellules NK. De nombreuses tentatives ont donc été faites pour identifier les ligands des récepteurs Ly49. Les conclusions de plusieurs de ces études font l'objet de la prochaine section.

2.3.2 Les ligands des récepteurs Ly49

Disons d'abord que l'observation initiale de Karlhofer, Ribaldo et Yokoyama (1992) concernant l'interaction de Ly49A avec H-2D^d a été confirmée par deux autres études (Daniels *et al.*, 1994a; Kane, 1994). L'étude de Kane a notamment mis à profit l'expression de Ly49A sur les cellules de certaines lignées, dont la lignée EL-4, pour étudier l'attachement de celles-ci à des molécules de classe I du CMH purifiées et fixées sur un support approprié. Cette approche a permis l'identification d'une seconde spécificité pour ce récepteur soit H-2D^k. Des travaux plus récents suggèrent que l'interaction entre Ly49A et H-2D^d purifié serait de forte affinité étant donné que le seuil de densité du récepteur Ly49A requis pour que la liaison soit observée est relativement bas (Chang *et al.*, 1996). Utilisant des cellules transfectées avec des ADNc de molécules de classe I du CMH et des souris transgéniques, Olsson-Alheim *et al.* (1999) viennent de démontrer que Ly49A se lie aussi à H-2D^p. A l'instar de ce qui a été observé avec H-2D^k, la liaison de Ly49A avec H2D^p est de moindre affinité que celle impliquant H-2D^d. Une

étude encore plus récente étend la liaison de Ly49A à des cellules d'haplotype H-2^f, H-2^g et H-2^f (Hanke *et al.*, 1999)

Trois observations principales sont à retenir des études concernant l'analyse de spécificité des autres récepteurs Ly49: d'abord, les récepteurs Ly49D (Nakamura *et al.*, 1999) et Ly49G2 (Mason *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1998) se lient à H-2D^d et, à tout le moins dans le cas de Ly49D, apparemment pas à H-2D^b ni à H-2K^b et H-2K^k. En second lieu, le récepteur Ly49C s'attache aux cellules cibles de plusieurs haplotypes dont H-2^b, H-2^d, H-2^k et H-2^s (Brennan *et al.*, 1994). Suite à des études avec des AcM bloquants, il a été établi que l'allèle de BALB/c de Ly49C se lie plus précisément à H-2K^b, H-2D^d et H-2K^d mais non à H-2D^b (Brennan *et al.*, 1996b). Toutefois, l'utilisation de cellules leucémiques de rat transfectées avec les ADNc de H-2D^d, D^b, K^b et K^k dans des test d'adhérence avec des cellules COS transfectées avec les ADNc des allèles de B6 de Ly49C ou Ly49I a permis de démontrer que Ly49C se lie à toutes ces molécules alors que Ly49I se lie très faiblement à H-2K^b et D^d et pas du tout aux autres molécules (Lian *et al.*, 1999). Enfin, dans un test d'adhérence à des cellules cibles exprimant les haplotypes b, d, k, et s, il a été observé que les cellules COS transfectées avec les ADNc des récepteurs Ly49B, Ly49E, Ly49F, Ly49H et Ly49I ne sont retenues par aucune des cellules cibles utilisées (Takei, Brennan et Mager, 1997). Il faut toutefois souligner que ce test n'est peut-être pas suffisamment sensible puisque dans les mêmes conditions les cellules COS transfectées avec Ly49D et Ly49G2 ne se sont pas attachées aux cibles H-2^d. Quoiqu'il en soit, un fait inattendu émerge de l'ensemble de ces observations soit l'interaction de la molécule H-2D^d avec au moins quatre récepteurs Ly49 et une faible liaison avec un cinquième. Puisque l'affinité de ces interactions varie vraisemblablement selon les récepteurs, on peut faire l'hypothèse que les seuils d'expression des récepteurs requis pour qu'il y ait signalisation seront distincts.

Dès la première étude de spécificité du récepteur Ly49A, il a été observé que son interaction avec H-2D^d impliquait les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule (Karlhofer, Ribaldo et Yokoyama, 1992). Une observation similaire a été rapportée en ce qui a trait à la liaison de l'allèle de BALB/c de Ly49C à H-2D^d (Brennan *et al.*, 1996b) et à la liaison

de l'allèle de B6 de Ly49G2 à H-2D^d (Johansson *et al.*, 1998). Considérant qu'il s'agit des domaines de liaison aux peptides, plusieurs groupes de recherche ont voulu caractériser de façon plus approfondie la nature de l'interaction entre les récepteurs Ly49 et les molécules de classe I du CMH. Une équipe a rapporté que la liaison entre le récepteur Ly49A et la molécule H2D^d nécessitait l'occupation de la niche à peptide mais que la composition du peptide ancré était d'importance négligeable (Correa et Raulet, 1995). Selon d'autres travaux, Ly49A se lierait à un déterminant conformationnel de H-2D^d lequel serait créé lors de l'insertion d'un peptide ayant des résidus d'ancrage appropriés pour se lier à H-2D^d (Orihuela, Margulies et Yokoyama, 1996). De plus, la mutation de résidus d'acide aminé situés à l'intérieur de la niche à peptide de la molécule H-2D^d peut altérer l'interaction de celle-ci avec le récepteur Ly49A en modifiant la capacité de liaison aux peptides de la molécule de classe I et/ou sa conformation tridimensionnelle (Waldenström *et al.*, 1998). A l'aide de molécules chimères constituées de différentes combinaisons des domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ des molécules H-2D^d et H-2D^b, il a été établi que la spécificité de liaison de Ly49A pour H-2D^d dépend strictement du domaine $\alpha 2$ (Sunbäck *et al.*, 1998), ce qui n'a pas été démontré jusqu'à présent pour les autres ligands de Ly49A.

Comme il a déjà été mentionné, les récepteurs Ly49 s'apparentent aux molécules de la superfamille des lectines de type C dont les ligands sont habituellement des résidus saccharidiques (Weis, Taylor et Drickamer, 1998). Bien qu'il semble que les récepteur Ly49 soient incapables de lier les ions Ca⁺⁺ (Weis, Taylor et Drickamer, 1998), la démonstration que le fucoidan inhibe l'interaction du récepteur Ly49A avec H-2D^d supporte la fonctionnalité du CRD dans un récepteur Ly49 (Daniels *et al.*, 1994b). De même, une liaison directe entre le récepteur Ly49C et divers polysaccharides sulfatés a été rapporté (Brennan *et al.*, 1995). Il est toutefois peu probable que ces polysaccharides soient de réels ligands du récepteur Ly49C étant donné qu'ils ne sont normalement pas présents dans les cellules de mammifères. Toutefois, on ne peut exclure que les différents monosaccharides constituant ces chaînes polysaccharidiques soient impliqués dans les interactions avec les récepteurs Ly49. Le rôle des résidus saccharidiques dans l'interaction des récepteurs Ly49 avec des molécules de classe I du CMH est aussi

supporté par le fait que la sulfatation des polysaccharides liées en *N* augmente l'affinité de la liaison avec Ly49A (Chang et Kane, 1998). En modifiant par mutagenèse dirigée l'un ou l'autre des deux sites de *N*-glycosylation qui sont conservés dans les molécules de classe I du CMH murin, Lian *et al.* (1998) ont localisé sur la chaîne $\alpha 2$ un site critique pour l'interaction de Ly49A et Ly49C avec H-2D^d. Par ailleurs, Matsumoto *et al.* (1998) ont rapporté que le récepteur Ly49A était aussi capable de se lier à une molécule H-2D^d non-glycosylée sur asparagine, soulevant la possibilité que le récepteur puisse avoir deux ligands ainsi qu'il a déjà été rapporté pour CD23 (Vercelli *et al.*, 1989; Aubry *et al.*, 1994), une autre molécule de la superfamille des lectines de type C. Cependant, les auteurs n'excluent pas la possibilité que les polysaccharides normalement liés à H-2D^d servent en fait à stabiliser voire même à augmenter l'affinité de l'interaction avec le récepteur Ly49A.

La caractérisation des domaines des récepteurs Ly49 impliqués dans l'interaction avec les molécules de classe I du CMH est nettement moins avancée. Jusqu'à tout récemment un seul groupe avait rapporté la contribution du CRD et d'une portion adjacente de la tige à l'interaction de l'allèle de BALB/c de Ly49C avec des cellules cibles exprimant les haplotypes H-2^b et H-2^s (Brennan *et al.*, 1996b). Une étude publiée en juin 1999 par la même équipe amène de nouveaux éléments à ce propos (Lian *et al.*, 1999). Il en sera question dans la discussion.

2.3.3 Fonctions inhibitrices associées aux récepteurs Ly49

Le fait que bon nombre de récepteurs Ly49 aient pour ligands des molécules de classe I du CMH a amené plusieurs chercheurs à considérer que les récepteurs Ly49 devaient être les récepteurs d'inhibition évoqués dans le modèle des deux récepteurs proposé par Yokoyama (1993). Les premières données supportant une fonction inhibitrice pour le récepteur Ly49A viennent de l'étude de Karlhofer, Ribaldo et Yokoyama (1992). En comparant l'activité lytique de cellules LAK de souris B6 exprimant ou non le récepteur Ly49A envers une gamme de cellules cibles exprimant différents haplotypes H-2, les auteurs ont observé que la plupart des cellules exprimant les haplotypes H-2^d et

H-2^k étaient résistantes à la lyse par les cellules Ly49A⁺ mais sensibles à la lyse par les cellules Ly49A⁻. En transfectant les ADNc des molécules H-2D^d, H-2K^d et H-2L^d dans les cellules d'une lignée sensible aux deux types d'effecteurs, ils ont observé l'acquisition d'une résistance spécifique aux cellules Ly49A⁺ pour les cellules exprimant H-2D^d. Cette résistance étant abolie en présence de fragments F(ab')₂ d'AcM dirigés contre le ligand ou le récepteur, les auteurs ont conclu à la nécessité de l'interaction Ly49A/H-2D^d pour qu'il y ait abolition du programme lytique.

Nous avons déjà mentionné dans la section 2.1 que la présence d'un récepteur d'activation sur la cellule NK et d'un ligand correspondant sur la cellule cible était essentielle pour qu'il y ait activation des propriétés lytiques d'une cellule NK. Dans le respect de ce contexte, Kim et Yokoyama (1998) ont développé un modèle pour évaluer l'effet de l'engagement du récepteur Ly49A sur l'exocytose granulaire et la production de cytokines par les cellules NK stimulées via un récepteur d'activation. Ces deux propriétés induites par l'AcM PK136 anti-NK1.1 adsorbé ne le sont plus si la stimulation se fait en présence d'un deuxième AcM, soit A1 (anti-Ly49A). Ces résultats confirment la capacité du récepteur Ly49A à produire un signal d'inhibition capable de renverser le signal d'activation résultant de l'engagement d'un autre récepteur et démontrent que l'engagement de Ly49A interrompt non seulement le programme lytique mais aussi la production de cytokines. D'autre part, puisque l'incapacité de la sous-population de cellules NK Ly49A⁻/Ly49G2⁺ de la souris B6 de lyser les cellules P815 (H-2D^d) est levée en présence d'AcM dirigés contre le récepteur ou le ligand, le récepteur Ly49G2 aurait donc lui aussi des propriétés inhibitrices (Mason *et al.*, 1995). Cette observation a été confirmée dans un modèle de souris B6 transgéniques exprimant H-2L^d, H-2D^d ou des molécules chimériques constituées des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ d'une de ces molécules et du domaine $\alpha 3$ de l'autre (Johansson *et al.*, 1998). Toutefois, les observations dans ces souris transgéniques de même que l'absence de protection contre la lyse par les cellules Ly49G2⁺ des cellules transfectées avec l'ADNc de H-2L^d démontrent que contrairement à ce qui avait été conclu par Mason *et al.* (1995), H-2L^d ne serait pas un ligand de Ly49G2. En utilisant des cellules triées sur la base de l'expression des récepteurs Ly49A ou Ly49G2 et des AcM dirigés contre ces récepteurs, Ortaldo *et al.* (1997) ont démontré que

ces deux récepteurs inhibaient non seulement l'activité lytique des cellules NK mais aussi leur capacité de sécréter de l'IFN- γ et du GM-CSF. Les résultats obtenus dans le cas du récepteur Ly49G2 demandent toutefois à être confirmés étant donné que les deux récepteurs ont la même spécificité, qu'une partie des cellules triées sur la base de l'expression d'un récepteur peuvent exprimer l'autre et qu'une réactivité croisée de l'AcM 4D11 avec Ly49A a été rapportée (Takei, Brennan et Mager, 1997; Salcedo *et al.*, 1997).

Ly49D et Ly49C sont les deux autres récepteurs Ly49 dont les propriétés ont été évaluées après engagement soit via une molécule de classe I du CMH soit via un AcM adsorbé sur un support approprié. Ils feront l'un et l'autre l'objet d'une section particulière après qu'aura été exposée la transduction des signaux d'inhibition.

2.3.4 Motif ITIM et transmission du signal d'inhibition

Les interactions moléculaires survenant suite à l'engagement du récepteur Ly49A sont maintenant bien définies. En scrutant attentivement les séquences prédites en acides aminés de la portion cytoplasmique des récepteurs Ly49, on a noté chez la majorité d'entre eux la présence d'un motif particulier formé d'une tyrosine précédée deux positions en amont par une valine ou une isoleucine et suivie trois positions en aval par une leucine ou une valine (I/VxYxxL/V). Cette séquence nommée ITIM pour Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif a d'abord été décrite dans les molécules Fc γ RIIB1 et CD22 dans lesquelles elle joue un rôle majeur dans l'inhibition du signal transmis par le récepteur des cellules B (D'Ambrosio *et al.*, 1995; Doody *et al.*, 1995). Dans ces deux molécules, la phosphorylation sur tyrosine de ce motif est responsable du recrutement de la PTP SHP-1 aussi appelée HCP ou PTPIC. Olcese *et al.* (1996) ont été les premiers à rapporter la liaison des PTP SHP-1 et SHP-2 à un peptide composé des 13 premiers acides aminés de la partie aminoterminal du récepteur Ly49A phosphorylé sur tyrosine. Les mécanismes d'inhibition enclenchés par l'engagement du récepteur Ly49A ont été rapidement élucidés. Utilisant des cellules de la lignée de rat RNK-16 transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49A, Nakamura *et al.* (1997) ont rapporté une diminution de

l'hydrolyse des phosphoinositides et l'abolition de l'activité des tyrosine kinases lors d'un contact avec les cellules P388D1 exprimant le ligand du récepteur (H-2D^d). Dans les mêmes conditions de stimulation, ils ont aussi démontré la co-précipitation de la PTP SHP-1 avec le récepteur Ly49A et établi l'importance de la tyrosine de l'ITIM dans le recrutement de SHP-1. La contribution de cette molécule à la transmission du signal d'inhibition a été confirmée en utilisant des cellules NK des souris mutantes «motheaten» (*me/me*) et «motheaten viables» (*me^v/me^v*). Ces mutations sont responsables d'une déficience fonctionnelle de la protéine SHP-1. Tel qu'attendu, les cellules Ly49A⁺ de ces souris sont capables de lyser des cellules cibles exprimant H-2D^d. Étant donné que le recrutement des PTP SHP-1 et SHP-2 requiert la phosphorylation de la tyrosine de l'ITIM, Mason *et al.* (1997) ont cherché la présence de récepteurs Ly49 phosphorylés dans des lysats de cellules LAK stimulées avec du pervanadate de sodium, un agent pharmacologique qui active les PTK et inhibe les tyrosine phosphatases (O'Shea *et al.*, 1992; Secrist *et al.*, 1993). Le récepteur Ly49A est effectivement phosphorylé dans ces conditions et la PTP SHP-1 est présente dans l'immunoprécipité. Les auteurs démontrent même la phosphorylation du récepteur Ly49A après stimulation avec l'AcM YE1/48. Des résultats semblables sont rapportés pour le récepteur Ly49G2 mais à notre avis ils demandent confirmation étant donné la réactivité croisée avec Ly49A de l'AcM 4D11 utilisé pour l'immunoprécipitation et l'activation.

Ly49A ni aucun autre des récepteurs Ly49 ne possédant d'activité tyrosine kinase intrinsèque, une autre enzyme doit être impliquée dans l'initiation de la transmission du signal d'inhibition généré par l'engagement du récepteur. L'hypothèse du co-engagement des récepteurs d'activation et d'inhibition fournit un modèle approprié (revu par Renard *et al.*, 1997). Ce serait ainsi une PTK activée suite à l'engagement d'un récepteur d'activation qui pourrait phosphoryler la tyrosine de l'ITIM du récepteur d'inhibition amené à proximité par le co-engagement. Bien que nous ayons choisi de ne pas discuter dans ce mémoire des récepteurs des cellules NK humaines, il importe tout de même de noter que, dans ces cellules, l'enzyme responsable de la phosphorylation du récepteur d'inhibition p70 est la p56^{lck} activée suite à l'engagement du récepteur CD16 (Binstadt *et al.*, 1996). Une fois phosphorylé, ce récepteur recrute SHP-1 et il s'en suit une diminution

importante de l'activité tyrosine kinase et une inhibition de l'ADCC normalement enclenchée par l'engagement du récepteur CD16.

Le récepteur Ly49A est considéré en quelque sorte comme le prototype des récepteurs d'inhibition de la famille Ly49. Toutes les données accumulées concernant ses propriétés inhibitrices de même que l'hypothèse du co-engagement des récepteurs d'activation et d'inhibition vérifiée à tout le moins dans les cellules humaines s'intègrent parfaitement dans le modèle des deux récepteurs exposé au début de ce chapitre. Vu son importance pour la compréhension des résultats présentés dans ce mémoire, nous croyons pertinent d'en illustrer le fonctionnement dans le cadre de l'hypothèse de l'absence du soi (Figure 2).

2.3.5 Ly49D: un récepteur d'activation se liant à une molécule de classe I du CMH

Contrairement aux récepteurs Ly49A et Ly49G2, la structure prédite en acides aminés de la portion cytoplasmique du récepteur Ly49D ne contient pas de séquence ITIM (Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994). Il n'a donc pas la capacité de recruter la PTP SHP-1 et de transmettre un signal d'inhibition (Mason *et al.*, 1997). Les premiers travaux portant sur la caractérisation de ce récepteur ont été effectués avec des cellules triées à l'aide d'un anticorps (12A8) reconnaissant un déterminant commun aux récepteurs Ly49A et Ly49D (Mason *et al.*, 1996). Pour cette raison, les auteurs ont dû procéder à la sélection des cellules Ly49D⁺/Ly49A⁻. Ils ont alors observé que celles-ci lysaient la majorité des cellules cibles indépendamment de leur haplotype et qu'en outre, l'addition de l'AcM 12A8 augmentait significativement la lyse de cellules exprimant des FcγR (ADCC inverse). Le traitement de cellules NK Ly49D⁺ avec l'AcM 12A8 induit la mort par apoptose des cellules ainsi activées. En ce qui a trait aux propriétés cytotoxiques des cellules NK, le récepteur Ly49D serait donc un récepteur d'activation et non d'inhibition. En démontrant que l'élimination des cellules Ly49D⁺ chez les souris B6 irradiées abolit leur capacité de rejeter des cellules de moelle osseuse d'haplotype H-2^d, Razziuddin *et al.* (1998) ont fait la démonstration d'un rôle *in vivo* pour cette population particulière de cellules NK et soulevé la possibilité que le ligand de Ly49D soit une

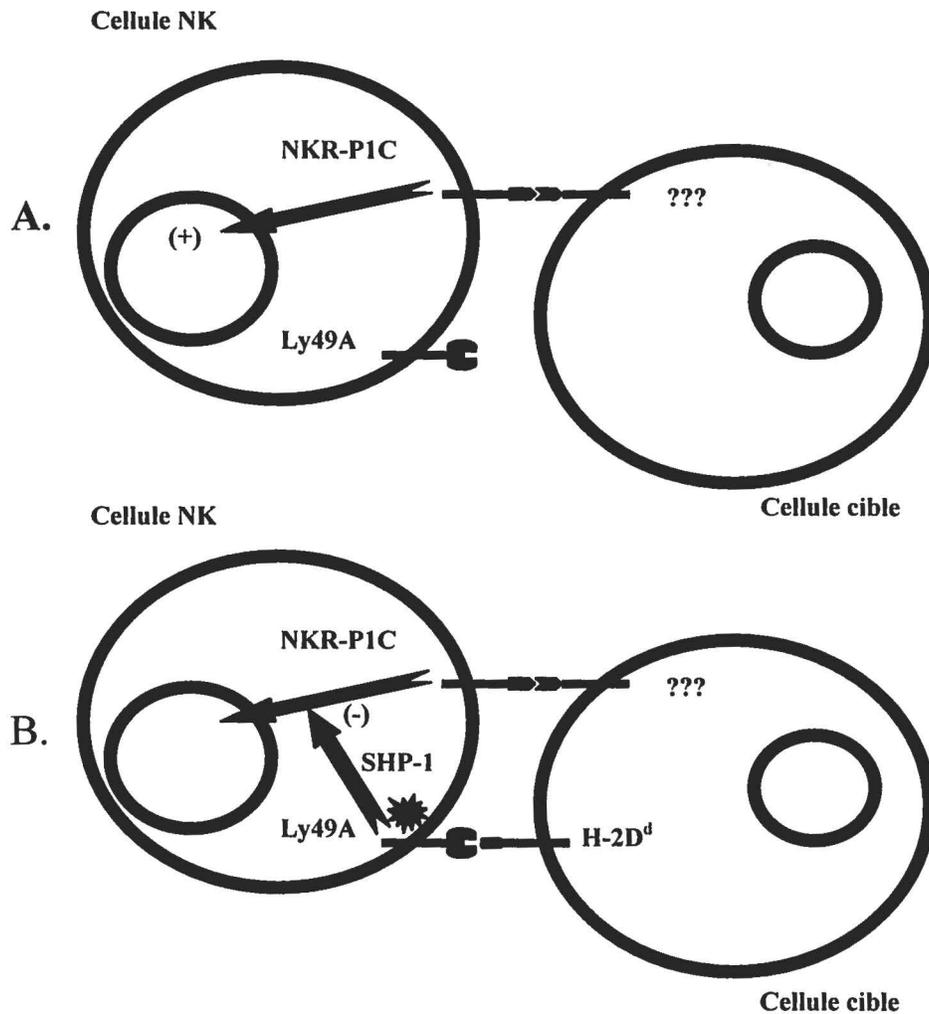


Figure 2. Hypothèse de l'absence du soi et le modèle des deux récepteurs. Exemple d'une situation impliquant les récepteurs NKR-P1C et Ly49A.

A. Rencontre d'une cellule cible sensible: la cellule cible n'exprime pas les molécules de classe I du CMH servant de ligands au récepteur Ly49A. Il n'y a pas de signal d'inhibition pour bloquer la transmission du signal d'activation à partir du récepteur NKR-P1C et la cellule est lysée.

B. Rencontre d'une cellule cible résistante: la cellule cible exprime la molécule H-2D^d servant de ligand au récepteur Ly49A. L'interaction entre ces deux molécules induit la phosphorylation sur tyrosine du motif ITIM présent dans la portion cytoplasmique du récepteur Ly49A et le recrutement subséquent de la PTP SHP-1. Celle-ci va ensuite déphosphoryler les molécules de signalisation activées suite à l'engagement du récepteur NKR-P1C et bloque ainsi la transmission du signal d'activation; la cellule cible n'est pas lysée.

molécule de classe I du CMH d'haplotype H-2^d. Comme le même traitement abolit la capacité des souris B6 irradiées de rejeter les cellules de souris transgéniques D8 (H-2^b, H-2D^d), la molécule H-2D^d est vraisemblablement le ligand de Ly49D. Ce fait a été confirmé dans des expériences de transfection utilisant comme cellules effectrices des cellules RNK-16 transfectées avec l'ADNc de Ly49D et des cellules cible de la lignée YB2/0 transfectées avec les ADNc de différentes molécules de classe I du CMH (Nakamura *et al.*, 1999). Utilisant des molécules chimères, ces auteurs ont aussi démontré qu'à l'instar de ce qui a été observé pour les récepteurs Ly49A et Ly49C, le domaine $\alpha 3$ de la molécule ligand n'intervient pas dans l'interaction avec le récepteur Ly49D.

L'étude de la transduction du signal d'activation suite à l'engagement du récepteur Ly49D a été inspirée des observations faites dans un autre modèle concernant la transduction du signal d'activation via le TCR. Cosson *et al.* (1991) avaient en effet démontré qu'un acide aminé chargé dans la portion transmembranaire de la chaîne α du TCR était responsable de l'association de celle-ci avec la chaîne CD3- δ qui possède dans sa région transmembranaire un acide aminé chargé de charge opposée. En scrutant de près les récepteurs de cellules NK, Vély et Vivier (1997) ont noté que la plupart des récepteurs n'ayant pas de séquence ITIM dans leur portion intracytoplasmique et ne pouvant donc transmettre de signal d'inhibition avaient par ailleurs un acide aminé chargé dans leur partie transmembranaire, ce qui devait théoriquement leur permettre de recruter une molécule adaptatrice. C'est notamment le cas de la chaîne α du récepteur Fc γ RIIIA dont nous avons discuté à la section 2.2.1 et qui s'associe soit à la chaîne CD3 ζ soit à la chaîne γ du Fc ϵ R1. Il en est de même pour les récepteurs de cellules humaines KIR2DS (p50) et CD94/NKG2C et pour les récepteurs murins Ly49D et Ly49H. En immunoprécipitant le récepteur Ly49D à partir de cellules NK activées par le pervanadate de sodium ou par l'engagement du récepteur avec l'AcM 4E5, Mason *et al.* (1998) ont détecté la présence d'une petite protéine associée de 16 kD, phosphorylée sur tyrosine et qui serait vraisemblablement responsable de la transduction du signal. À la même période, la molécule DAP12 a été identifiée comme étant la molécule adaptatrice responsable de la transduction du signal d'activation via KIR2DS (p50) (Lanier *et al.*, 1998a) et CD94/NKG2C (Lanier *et al.*, 1998b). Il est intéressant de noter ici que ces deux

types de récepteurs se liant à des molécules du CMH appartiennent à des familles qui, comme la famille Ly49, contiennent des récepteurs d'activation et des récepteurs d'inhibition. En outre, les récepteurs CD94/NKG2 existent également dans les cellules murines. Toutefois, les deux groupes qui ont rapporté le clonage de l'ADNc du NKG2C murin ne s'entendent pas sur la présence d'un acide aminé chargé dans la région transmembranaire (Lohwasser *et al.*, 1999; Silver, Lau et Kane, 1999). Ce point devra être éclairci considérant l'importance fonctionnelle de ces résidus pour le recrutement d'une molécule adaptatrice. Bien que ce groupe de récepteurs n'aient pas été décrit en détails dans le présent mémoire, il convient de mentionner que ce sont des protéines hétérodimériques dont les chaînes sont réunies par des ponts disulfure et, qu'à l'instar des récepteurs Ly49, elles s'apparentent aux molécules de la superfamille des lectines de type C (revu par Lanier, 1998).

Suite à leurs travaux sur la transduction des signaux via les récepteurs d'activation des cellules humaines, l'équipe du Dr Lanier s'est évidemment empressée de rechercher l'existence de DAP12 dans le modèle murin et son association éventuelle avec les récepteurs Ly49D et Ly49H (Smith *et al.*, 1998). Dans le cas de Ly49H, ils ont dû utiliser une molécule chimère puisqu'aucun AcM ne permet d'immunoprécipiter ce récepteur. L'association de DAP12 aux récepteurs Ly49D et Ly49H a été établie de même que son rôle dans l'expression de ces récepteurs à la surface des cellules et bien sûr dans la transduction du signal d'activation. Comme la molécule DAP12 possède dans sa portion intracytoplasmique une séquence ITAM, elle serait capable de recruter des PTK de la famille Src et/ou de la famille Syk et de déclencher la cascade d'activation. Ces faits ont été récemment confirmés par McVicar *et al.* (1998) qui démontrent par ailleurs que contrairement à ce qui a été rapporté pour la molécule DAP12 humaine (Lanier *et al.*, 1998a), syk mais non ZAP-70 se lie à DAP12 après engagement du récepteur Ly49D. En ce qui concerne le récepteur Ly49H, une étude très récente vient de démontrer que suite à l'engagement de ce récepteur, la phosphorylation sur tyrosine du motif ITAM de la molécule DAP12 entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire des ions Ca^{++} et une sécrétion accrue de TNF- α (Gosselin *et al.*, 1999).

Les propriétés attribuées au récepteur Ly49D démontrent que l'interaction avec des molécules de classe du CMH est, comme chez l'humain, commune à des récepteurs d'activation et des récepteurs d'inhibition. Le récepteur Ly49H a aussi des propriétés activatrices mais on ne sait encore rien de sa spécificité. Puisque Ly49D se lie à la molécule H-2D^d qui est aussi un ligand des récepteurs d'inhibition Ly49A et Ly49G2, la question se pose à savoir comment se traduisent les signaux dans les cellules qui coexpriment ces récepteurs. À ce sujet, George *et al.* (1999) ont proposé que la reconnaissance de molécules de classe I allogéniques par des récepteurs Ly49 activateurs pourrait déclencher le signal d'activation nécessaire à la phosphorylation sur tyrosine du motif ITIM des récepteurs Ly49 inhibiteurs et au recrutement subséquent de la PTP SHP-1. Ainsi, l'engagement simultané d'un récepteur Ly49 inhibiteur déclencherait un signal capable de surpasser le signal d'activation alors que l'absence de molécules capables d'engager les récepteurs d'inhibition, à la surface de la cellule cible, mènerait celle-ci à sa perte (George *et al.*, 1999). D'autres récepteurs de la famille Ly49 ont également des caractéristiques structurales intrigantes. C'est le cas notamment du récepteur Ly49C auquel nous nous sommes particulièrement intéressés dans ce mémoire.

2.3.6 Ly49C: un récepteur à la structure et aux propriétés paradoxales

L'histoire de ce récepteur dont l'identification remonte à une décennie est difficile à relater puisqu'elle contient de sérieux éléments de confusion. En 1989, Sentman *et al.* rapportent la production d'un AcM appelé SW5E6 reconnaissant une sous-population de cellules NK chez plusieurs souches de souris notamment B6, BALB/c, C3H et NZB. Ils démontrent la contribution de la population de cellules 5E6⁺ au rejet de greffe de moelle osseuse et mentionnent que chez les souris B6 et NZB, cet AcM précipite une protéine de 108-110 kD formée de deux chaînes semblables réunies par des ponts disulfure. En 1995, la même équipe clone chez différentes souches un ADNc codant la molécule reconnue par l'AcM SW5E6 et l'identifie comme étant le récepteur Ly49C (Stoneman *et al.*, 1995). Ce groupe démontre le polymorphisme du gène en détectant au moins quatre patrons de RFLP (Restricted Fragment Length Polymorphisms). Les souches BALB/c, DBA/2 et C3H expriment le même allèle que celui cloné initialement chez CBA (Wong *et al.*, 1991)

alors que ceux de B6, NZB et 129/J se distinguent l'un de l'autre et du premier groupe. Des expériences d'immunoprécipitation révèlent des différences de taille dans les molécules (54 à 65 kD en conditions réductrices) que les auteurs attribuent à des nombres variables de sites de *N*-glycosylation sur les différents allèles. Held, Roland et Raullet (1995) rapportent que les allèles B6 et 129/Sv de Ly49C sont différents l'un de l'autre mais qu'ils sont tout de même identiques à 98% et qu'ils présentent par ailleurs l'un et l'autre des différences plus nombreuses en comparaison avec la séquence publiée initialement (Wong *et al.*, 1991). La confusion est à son comble quand Sundbäck, Kärre et Sentman (1996) clonent à leur tour chez A/J un ADNc identique à la séquence de CBA, BALB/c, DBA/2 et C3H et, chez B6, une séquence Ly49C différente de celle déjà rapportée.

Dans un travail de collaboration avec l'équipe du Dr Takei, notre laboratoire a contribué à éclaircir la situation. Ainsi, Brennan *et al.* (1996a) ont cloné chez B6 deux séquences Ly49C correspondant dans le premier cas à celles de Stoneman *et al.* et de Held, Roland et Raullet, et dans le second à celle de Sundbäck, Kärre et Sentman. Ils ont étudié leur expression par transfection dans des cellules COS à l'aide de deux AcM: le SW5E6 et le 4LO3311 (Lemieux *et al.*, 1991), un manuscrit alors sous presse ayant rapporté que ce dernier reconnaît aussi le récepteur Ly49C, signant dès lors son identité avec la molécule NK2.1 (Gosselin *et al.*, 1997). Alors que les deux anticorps réagissent avec le récepteur codé par la séquence de BALB/c, 4LO3311 se lie à une seule des molécules codées par les séquences clonées chez B6 mais SW5E6 réagit avec les deux. La conclusion de ces expériences est que l'AcM SW5E6 reconnaît un déterminant commun à deux récepteurs, Ly49C et Ly49I. Cette observation est en accord avec le fait que le nombre de cellules NK de B6 qui réagissent avec l'AcM SW5E6 est nettement supérieur au nombre de celles qui sont détectées par l'AcM 4LO3311. Dans des travaux antérieurs, notre laboratoire avait rapporté qu'à partir des cellules NK de BALB/c l'AcM 4LO3311 immunoprécipitait une protéine de 130 kD, fortement glycosylée, formée par l'association de deux chaînes de 65 kD (Gosselin, Lusignan et Lemieux, 1993). Celle-ci correspond parfaitement à la molécule immunoprécipitée par l'AcM SW5E6 à partir des cellules LAK de BALB/c (Stoneman *et al.*, 1995). D'après des analyses par cytométrie en

flux, le récepteur Ly49I pourrait ne pas être exprimé chez BALB/c (Brennan *et al.*, 1996a). On peut à tout le moins affirmer que s'il existe chez BALB/c un allèle de Ly49I, il est différent de celui exprimé chez B6 puisque l'AcM SW5E6 ne le détecte pas. Contrairement à ce qui avait été proposé par Stoneman *et al.* en 1995, il n'y a pas de différences entre les allèles de B6 et BALB/c de Ly49C en ce qui concerne le nombre de sites potentiels de *N*-glycosylation. Cette observation est en accord avec le fait que l'AcM 4LO3311 immunoprécipite des protéines de même taille à partir des cellules LAK de ces deux souches (Gosselin, Lusignan et Lemieux, 1992). La taille plus faible de la molécule détectée chez B6 après immunoprécipitation avec l'AcM SW5E6 est vraisemblablement due à l'immunoprécipitation préférentielle de la molécule Ly49I qui elle a réellement un site de *N*-glycosylation en moins. De fait, la molécule immunoprécipitée avec l'AcM SW5E6 à partir des cellules transfectées avec Ly49I^{B6} est composée de deux sous-unités de 54 kD (Stoneman *et al.*, 1995). Il faut aussi considérer que la molécule détectée chez NZB avec l'AcM SW5E6 est probablement un allèle de Ly49I plutôt que de Ly49C. La protéine précipitée par SW5E6 à partir des cellules de NZB correspond en effet à un dimère dont les sous-unités ont 54 kD (Sentman *et al.*, 1989). En outre, la comparaison des séquences prédites en acides aminés révèle un site de *N*-glycosylation en moins par rapport à la séquence de Ly49C et des différences au niveau d'une douzaine de résidus par rapport à Ly49I de B6 alors qu'il y en a 22 par rapport à Ly49C (Held, Roland et Raulet, 1995; Stoneman *et al.*, 1995; Brennan *et al.*, 1996a). De plus, l'AcM 4LO3311 ne réagit pas avec les cellules NK et LAK de la souris NZB (Lemieux *et al.*, 1991; Morelli, Lusignan et Lemieux, 1992).

Il est intéressant de noter que le déterminant reconnu par l'AcM 4LO3311 est localisé sur une portion de la tige adjacente au CRD alors que celui reconnu par SW5E6 est dans le CRD (Brennan *et al.*, 1996a). En utilisant des molécules chimères constituées de portions variables des récepteurs Ly49C et Ly49I de B6 de même que des mutants de Ly49C^{B6}, Lian *et al.* (1999) ont récemment identifié des résidus critiques pour l'attachement de ces deux anticorps à leur déterminant respectif et aussi pour la liaison de chacun de ces récepteurs à différents ligands.

La reconnaissance de deux récepteurs par l'AcM SW5E6 oblige à reconsidérer l'interprétation des travaux ayant utilisé ce réactif pour étudier les propriétés du récepteur Ly49C. Mises à part les observations chez BALB/c qui restent valides puisque le récepteur Ly49I n'est pas détecté dans cette souche par l'AcM SW5E6 et chez NZB dont les cellules NK ne réagissent pas avec l'AcM 4LO3311, toutes les autres propriétés pourraient être dues à Ly49C comme à Ly49I. Si on s'en tient aux faits les plus sûrs, on peut d'abord dire que le récepteur Ly49C^{BALB} se lie à plusieurs molécules de classe I du CMH dont H-2K^b, K^d, D^d mais non H-2D^b et s'attache également à des molécules nonidentifiées des haplotypes H-2^s et H-2^k (Brennan *et al.*, 1996b). Des cellules COS transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49C^{B6} adhèrent à des cellules cibles d'haplotype H-2^d et H-2^b mais dans les mêmes conditions, celles transfectées avec l'ADNc de Ly49I^{B6} n'adhèrent pas (Brennan *et al.*, 1996a). Un travail plus récent utilisant comme cellules cibles des cellules transfectées avec les ADNc de molécules de classe I du CMH, précise comme suit la spécificité de ces récepteurs: Ly49C^{B6} se lie très fortement à H-2K^k et K^b et à un degré moindre à H-2D^b et D^d; Ly49I^{B6} se lie très faiblement à H-2K^b et D^d mais ces derniers résultats ne sont pas statistiquement significatifs (Lian *et al.*, 1999). D'autre part, Hanke *et al.* (1999) ont observé que les allèles BALB/c et B6 du récepteur Ly49C étaient également capables de se lier à des lymphoblastes d'haplotype b, d, k, f, q, r, s et v, la liaison la plus forte étant observée avec les lymphoblastes d'haplotype H-2^b pour les deux allèles. L'attachement à des cibles H-2^b de cellules transfectées avec une molécule chimère composée de portions de Ly49A^{B6} et Ly49C^{BALB} requiert le CRD et une courte portion de la tige de Ly49C (Brennan *et al.*, 1996b). Avec des chimères constituées de portions des allèles de B6 des récepteurs Ly49C et Ly49I, le CRD de Ly49C suffit à la tâche (Lian *et al.*, 1999).

Les propriétés fonctionnelles du récepteur Ly49C sont ambivalentes. D'une part, Murphy *et al.* (1995) ont rapporté que les cellules 5E6⁺ de souris C.B17 *scid/scid* (fond BALB/c) étaient capables de promouvoir la croissance de cellules de moelle osseuse syngénique en culture, une fonction qui serait reliée à leur capacité de produire du GM-CSF. Cette propriété se vérifie *in vivo*, les auteurs ayant démontré que les cellules 5E6⁺ favorisaient le développement des cellules de moelle osseuse après une

transplantation syngénique chez des souris BALB/c. Chez les souris B6, les cellules 5E6⁺ seraient plutôt responsables du rejet de greffes de moelle osseuse d'haplotype H-2^d (Sentman *et al.*, 1989). Les auteurs ont suggéré que les allèles exprimés chez B6 et BALB/c puissent avoir des propriétés différentes mais nous savons aujourd'hui que, chez B6, il faut aussi prendre en compte l'hétérogénéité de la population sélectionnée avec l'AcM SW5E6.

Concernant toujours les propriétés du récepteur Ly49C chez la souris BALB/c, Yu *et al.*, (1996) ont rapporté que les cellules triées avec l'AcM SW5E6 ne pouvaient lyser les lymphoblastes de souris B6 (H-2^b) ou BALB/c (H-2^d) qu'en présence de fragments F(ab')₂ de l'AcM SW5E6. Ils ont conclu qu'à l'instar du récepteur Ly49A, l'engagement du récepteur Ly49C par un ligand présent sur les lymphoblastes transmettait un signal d'inhibition à la cellule NK mais que ce signal ne pouvait être produit en présence d'un anticorps empêchant l'interaction ligand/récepteur. Ces expériences ont été reprises en utilisant des fragments F(ab')₂ de l'AcM 4LO3311 au lieu de SW5E6 et des résultats semblables ont été obtenus (T.C. George, communication personnelle). Il ne faut pas s'en étonner puisque chez BALB/c, les deux anticorps détectent un seul et même récepteur (Brennan *et al.*, 1996a).

Les observations dont nous venons de faire état suggèrent une analogie fonctionnelle entre le récepteur Ly49C et les récepteurs Ly49A et Ly49G2. Supposant que la transduction du signal d'inhibition puisse se faire comme pour Ly49A et Ly49G2, Mason *et al.* (1997) ont recherché la phosphorylation du récepteur Ly49C et son association avec la PTP SHP-1 après immunoprécipitation avec l'AcM SW5E6 suite à l'activation des cellules LAK de B6 avec du pervanadate de sodium. Bien qu'ils aient démontré dans ces conditions la phosphorylation du récepteur Ly49C, une étape essentielle au recrutement de la PTP SHP-1, ils n'ont pas réussi à détecter celle-ci dans l'immunoprécipité. La phosphorylation sur tyrosine se situe forcément au niveau de la séquence ITIM puisque ce n'est qu'à ce niveau qu'il y a un résidu tyrosine dans la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C (Wong *et al.*, 1991). Les conditions requises pour le recrutement de SHP-1 étaient donc théoriquement présentes. La réactivité de l'AcM

SW5E6 avec deux récepteurs peut difficilement être invoquée pour expliquer que le recrutement de cette PTP n'ait pu être observé. En effet, les séquences de la portion cytoplasmique des récepteurs Ly49C et Ly49I détectés par cet anticorps ne diffèrent que par quatre acides aminés et possèdent une séquence ITIM absolument identique. Même si l'immunoprécipité contenait probablement deux récepteurs, les deux avaient théoriquement la même capacité de recruter SHP-1. C'est peut-être plutôt le niveau d'expression du récepteur Ly49C qui constitue la source du problème. Chez les souris B6 (H-2^b) qui expriment des ligands pour lesquels le récepteur Ly49C a une forte affinité, le niveau d'expression de Ly49C est 8 à 10 fois inférieur à celui observé chez les souris BALB/c (H-2^d) dont les ligands se lient plus faiblement à ce récepteur (Gosselin *et al.*, 1997).

Malgré le fait que le récepteur Ly49C puisse vraisemblablement générer un signal d'inhibition dans certaines conditions, on ne peut ignorer que les travaux de Murphy *et al.*, (1995) ont plutôt suggéré que les cellules de souris BALB/c qui portent ce récepteur jouent un rôle de stimulation de la croissance des cellules hématopoïétiques. En outre, avant même que l'identité entre la molécule NK2.1 et le récepteur Ly49C ait été établie, notre laboratoire avait rapporté que l'AcM 4LO3311 adsorbé dans les puits d'une plaque de culture augmentait l'exocytose granulaire des cellules NK2.1⁺ de BALB/c précultivées en présence d'IL-2 (Morelli et Lemieux, 1993). Au bilan des propriétés de ce récepteur, on trouve donc des éléments qui en font un récepteur d'inhibition et d'autres qui le classent parmi les récepteurs d'activation.

La structure prédite en acides aminés des portions cytoplasmique et transmembranaire du récepteur Ly49C nous fournit quelques éléments à considérer pour comprendre l'ambivalence fonctionnelle apparente de ce récepteur. Il convient de souligner d'abord que la séquence ITIM du récepteur Ly49C est tout-à-fait identique à celle du récepteur Ly49G2 et ce pour les deux allèles de B6 et BALB/c (Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994; Brennan *et al.*, 1996a). Par contre, il y a un autre résidu tyrosine en position 36 dans les récepteurs Ly49A et Ly49G2 et même un troisième en position 39 dans le récepteur Ly49G2 alors que la seule tyrosine présente dans la portion

cytoplasmique du récepteur Ly49C est contenue dans la séquence ITIM (Wong *et al.*, 1991; Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994). En outre, contrairement aux récepteurs Ly49A et Ly49G2, la séquence du récepteur Ly49C contient un acide aminé chargé en position 4 de la portion transmembranaire. Nous avons souligné précédemment que pour les récepteurs d'activation, la présence d'un résidu chargé dans la région transmembranaire permettait le recrutement d'une molécule adaptatrice requise pour la transduction du signal d'activation généré par leur engagement.

Tenant compte des particularités structurales du récepteur Ly49C et du fait que son niveau d'expression varie énormément d'une souche de souris à l'autre, apparemment en fonction de l'haplotype H-2 et sachant que le récepteur Ly49C se lie à plusieurs ligands, vraisemblablement avec des affinités variables, nous avons fait l'hypothèse que ce récepteur puisse générer des signaux différents selon les conditions de son engagement. Évaluer la pertinence de cette hypothèse était l'objectif visé dans ce mémoire. Nous avons d'abord choisi d'étudier une manifestation de l'activation des cellules NK autre que l'activité cytotoxique, soit l'accumulation d'ARNm spécifiques de différentes cytokines, suite à l'engagement du récepteur Ly49C par l'AcM 4LO3311. Afin de vérifier si la nature du signal engendré pouvait varier en fonction de la portion du récepteur lié par l'anticorps, nous avons comparé l'effet des AcM 4LO3311 et SW5E6, qui se lient respectivement à la tige et au CRD, sur des cellules LAK dérivées de BALB/c chez qui l'AcM SW5E6 ne détecte pas le récepteur Ly49I. Parallèlement, nous avons évalué la phosphorylation sur tyrosine de la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C et sa capacité de recruter la PTP SHP-1.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Anticorps monoclonaux et antisera

La majorité des anticorps monoclonaux (AcM) utilisés dans le travail expérimental relaté dans ce mémoire ont été purifiés à partir de surnageants de culture d'hybridomes produits dans notre laboratoire (4LO3311: IgG3 de souris anti-Ly49C; 4LO439: IgG3 de souris anti-Ly49G2; 5GA5: IgG de hamster anti-Ly49C/I), gracieusement fournis par des collègues (A1: IgG2a de souris anti-Ly49A, obtenu du Dr J.P. Allison, University of California, Berkeley, Ca, USA; MT4: IgG2b de rat anti-CD4, obtenu du Dr E.F. Potworowski, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec; A.1.9: IgG3 de souris anti-protéine S du coronavirus murin, obtenu du Dr P. J. Talbot, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec) ou achetés de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) (M1/69.16.11.HL: IgG2b de rat anti-CD24 (HSA, Heat Stable Antigen); 53.6.52: IgG2a de rat anti-CD8; 2.4G2: IgG2b de rat anti-Fc γ RII/Fc γ RIII; PK136: IgG2a de souris anti-NK1.1; 4D11: IgG2a de rat anti-Ly49G2). A cet effet, les surnageants sont d'abord centrifugés à 6000 x g pendant 20 min, concentrés 10 fois sous agitation dans une cellule Amicon sur une membrane Diaflo XM-100 (Amicon Canada Ltd., Oakville, Ontario) puis dialysés contre de l'eau physiologique tamponnée à pH 7,4 (PBS, Phosphate Buffered Saline) et enfin passés sur une colonne de protéine G-Sépharose[®] 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech, Baie D'Urfé, Québec, Canada). Les AcM adsorbés sont élués avec un tampon d'acétate d'ammonium 0,5 M à pH 3,0, le pH de l'éluat étant immédiatement neutralisé par l'ajout de 0,7 volume de tampon Tris-HCl 1 M à pH 8,8. Le volume de l'éluat est réduit par filtration sur une membrane Diaflo de type XM-100 jusqu'à l'obtention d'une concentration protéique d'environ 1 mg/ml puis dialysé contre du PBS à pH 7,4. Les AcM sont distribués en aliquots de petits volumes et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Les immunoglobulines IgG2b et IgG3 de souris, IgG2b de rat et les IgG de hamster utilisées comme témoins isotypiques ont été achetées chez Pharmingen Canada INC., (Mississauga, Ontario). L'AcM 4-11.G6 (IgG2a de souris qui réagit avec la

protéine S de la souche A59 du coronavirus murin et qui a aussi servi de témoin isotypique) nous a été donné par le Dr P. J. Talbot (INRS-Institut Armand-Frappier) alors que l'AcM YE1/32 (IgG2a de rat anti-Ly49A) et l'AcM SW5E6 (IgG2a de souris anti-Ly49C/I) nous ont été fournis par le Dr F. Takei, (Terry Fox Laboratory, Vancouver, BC, Canada). Les anticorps polyclonaux anti-IgG de souris et anti-IgG de lapin marqués à la peroxidase de raifort nous ont été fournis par le Dr P. Duplay (INRS-Institut Armand-Frappier) de même que l'AcM 4G10 (IgG2b de souris anti-phosphotyrosine). L'anticorps polyclonal anti-SHP-1 a été fourni par le Dr S.-H. Shen (Institut de Recherches en Biotechnologie, Montréal, Québec) et l'anticorps anti-SHP-2 a été acheté chez Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Les IgG de chèvre spécifiques du fragment Fc des IgG de souris, les fragments F(ab')₂ d'IgG de chèvre spécifiques des chaînes lourdes et légères des IgG de souris et les fragments F(ab')₂ d'IgG de chèvre spécifiques des chaînes lourdes et légères des IgG de rat utilisés dans les stimulations des cellules LAK par la méthode indirecte décrite à la section 3.5.2 ont été achetés chez Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA USA). Les fragments F(ab')₂ d'IgG de chèvre anti-IgG de hamster proviennent de chez Cedarlane (Hornby, Ontario, Canada). L'AcM 4G10 marqué à la biotine a été obtenu chez Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA).

3.2 Enrichissement des cellules NK

3.2.1 Méthode de base

Les cellules NK spléniques de souris BALB/c, C57BL/6 (B6) ou (BALB/c x C57BL/6)F₁ (CB6) obtenues de Charles River Canada (St-Constant, Québec) ont été enrichies par sélection négative sur la base d'une procédure déjà décrite (Gosselin *et al.*, 1997). En bref, la suspension cellulaire préparée dans la solution de Hanks (HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution, GIBCO BRL, Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) est d'abord débarrassée des érythrocytes par lyse osmotique. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO BRL) contenant 5% (v/v) de sérum foetal bovin (SFB, GIBCO BRL). Les lymphocytes B et les macrophages sont éliminés par deux cycles de filtration sur une colonne de laine de nylon prééquilibrée avec du milieu préchauffé à 37°C. A l'étape suivante, les cellules

récupérées dans l'éluat sont d'abord incubées 20 min à 4°C avec un AcM de rat anti-CD4 (clone MT4) ajouté directement sur le culot cellulaire. Des AcM de rat anti-CD8 (clone 53-6.72, ATCC TIB 105) et de rat anti-CD24 (clone M1/69.16.11.HL, ATCC TIB 125) sont ensuite ajoutés aux cellules et l'incubation sur glace est poursuivie pour une période additionnelle de 30 min. La concentration des AcM est prédéterminée pour chaque lot. Les cellules sont lavées deux fois avec du HBSS pour éliminer les anticorps non fixés puis des billes magnétiques couplées à des anticorps de chèvre anti-IgG de rat (Dynabeads M-450, Dynal Inc., Great Neck, NY, USA) sont ajoutées à la suspension à raison de 125 µl pour 1×10^7 cellules, soit 5 billes par cellule. Après une incubation de 30 min sur glace, les cellules adsorbées aux billes sont éliminées par trois cycles de contact avec un aimant.

3.2.2 Sélection à l'aide de billes magnétiques

Pour certaines expériences, une sous-population particulière de cellules NK a été sélectionnée positivement avec des billes magnétiques. A cet effet, les cellules NK, enrichies en conditions stériles selon la procédure décrite à la section 3.2, sont mises en suspension à la concentration de 1×10^7 /ml dans du PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} contenant 1% (p/v) de sérumalbumine bovine (SAB, Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec) puis incubées sur glace pendant 45 min avec un AcM (IgG3) dirigé contre le marqueur de surface Ly49C exprimé seulement sur certaines cellules. La concentration de l'anticorps est fixée à 5 µg pour 1×10^6 cellules positives attendues. Cette donnée est calculée sur la base du taux de cellules positives obtenu lorsque des cellules NK de souris de même souche sont incubées avec le même AcM couplé à la biotine et un conjugué streptavidine-RED670™ (SA-RED670, GIBCO BRL), dans les conditions décrites à la section 3.4. Après deux lavages avec le même milieu pour éliminer les anticorps libres, les cellules sont remises en suspension à la concentration de 1×10^7 /ml puis incubées 45 min sur glace avec des billes magnétiques couplées à des IgG de chèvre anti-IgG3 de souris (Dynal Inc., Great Neck, NY, USA). Les cellules attachées aux billes sont sélectionnées par trois cycles de contact avec un aimant. Elles sont immédiatement mises en culture dans les conditions décrites à la section 3.3. Les cellules qui sont demeurées en

suspension lors des contacts avec l'aimant sont aussi recueillies par centrifugation puis mises en culture dans les mêmes conditions. Après 48 h, les billes qui se sont détachées des cellules sélectionnées positivement sont éliminées par contact avec l'aimant puis les cellules sont remises en culture dans du milieu frais.

3.3 Production des cellules LAK

Pour la production des cellules LAK (Lymphokine-Activated Killer), les cellules NK ou certaines de leurs sous-populations, enrichies en conditions stériles selon les procédures décrites précédemment, sont mises en culture à raison de 1×10^6 cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% (v/v) de SFB, 300 U/ml d'IL-2 murine recombinante (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec) et 5×10^{-5} M de β -2-mercaptoéthanol (Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA). La culture est maintenue à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ pendant 6 à 8 jours en conservant la concentration cellulaire à peu près constante par l'ajout, au besoin, de milieu frais contenant du sérum, de l'IL-2 et du β -2-mercaptoéthanol. Les cellules non adhérentes sont prélevées d'abord et seront ajoutées aux cellules adhérentes après que celles-ci auront été récoltées dans du PBS contenant 0,1% (p/v) d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA, Sigma Chemical).

3.4 Analyse cytofluorométrique

Le phénotype des cellules obtenues après enrichissement ou culture en présence d'IL-2 est établi par cytométrie en flux après coloration avec des anticorps couplés à la biotine. Les cellules NK ou LAK sont distribuées dans des microtubes de 1,5 ml à raison de 3×10^5 cellules par tube et lavées deux fois avec du PBS sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ contenant 1% (p/v) de SAB et 0,2% (p/v) d'azoture de sodium (NaN₃, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Les AcM, couplés à la biotine selon la technique conventionnelle, sont ajoutés à une concentration prédéterminée dans un volume de 100 μ l et les cellules sont incubées pendant 30 min à 4°C puis lavées deux fois avec du PBS complet. Le marquage est révélé par une incubation additionnelle de 30 min à 4°C avec la streptavidine couplée à la

phycoérythrine (SA-PE) ou au RED670™ (SA-RED670) (GIBCO BRL) à une concentration prédéterminée pour chaque lot, suivie de deux lavages avec du PBS complet. Les cellules marquées sont fixées avec 400 µl d'une solution de paraformaldéhyde à 1% (v/v) (GIBCO BRL). Les échantillons sont analysés à l'aide d'un cytofluoromètre Coulter® EPICS® XL (Coulter Electronics of Canada, Ltd, Burlington, Ontario) muni d'un laser argon de 15 mW émettant à 488 nm. Les données recueillies pour chaque échantillon portent sur 10 000 évènements mesurés dans une zone d'intérêt correspondant à la population lymphocytaire définie selon les paramètres usuels de taille (forward scatter) et de granularité (side scatter).

3.5 Stimulation des cellules LAK via le récepteur Ly49C

3.5.1 Méthode directe

L' AcM anti-Ly49C, purifié à partir de l'hybridome 4LO3311 selon la méthode décrite à la section 3.1, est dilué à 50 µg/ml dans du PBS sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ et des échantillons de 50 µl sont distribués dans les puits d'une microplaque de culture de 96 puits à fond plat (microplaques Maxi-Sorp, Nunc, Naperville, IL, USA). Pour favoriser l'adsorption des AcM, les microplaques sont incubées pendant 90 min à 37°C puis conservées à 4°C pour une nuit. Les AcM non adsorbés sont éliminés par trois lavages des puits avec du PBS sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ juste avant l'addition des cellules.

Toutes les stimulations ont été effectuées avec des cellules LAK. Au moment du prélèvement, les cellules sont d'abord lavées trois fois avec du PBS pour éliminer toute trace d'IL-2 puis elles sont resuspendues à la concentration de 4×10^6 cellules/ml dans du RPMI 1640 contenant 10% de SFB (v/v) et incubées en absence ou en présence d'une quantité minimale d'IL-2 pour 1 h à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Cette opération a pour but de réduire leur métabolisme à un niveau basal. La suspension cellulaire est alors diluée avec un volume du même milieu auquel une quantité minimale d'IL-2 a été ajoutée pour une concentration finale de 20 ou 50 U/ml. Des échantillons de 100 µl (2×10^5 cellules/puit) sont distribués dans les puits contenant

l'anticorps adsorbé. Les cellules distribuées dans des puits vides donnent la mesure du niveau basal des paramètres étudiés alors que les cellules distribuées dans des puits dans lesquels ont été adsorbés des AcM de même isotype mais de spécificité différente constituent les témoins négatifs. Aussi, l'ajout au milieu de 100 ng/ml d'un ester de phorbol (PMA, Phorbol Myristate Acetate, Sigma Chemical) et de 1 $\mu\text{g/ml}$ de calcium ionophore A23187 (Boehringer Mannheim) constitue le témoin positif de stimulation. Des AcM dirigés contre des récepteurs d'activation (2.4G2, anti-Fc γ RII/Fc γ RIII; PK136, anti-NK1.1) de même que des anticorps dirigés contre d'autres épitopes du récepteur Ly49C ou d'autres récepteurs Ly49 ont été utilisés à l'occasion pour la stimulation des cellules LAK. Dans certaines expériences, ce sont des fragments F(ab')₂ préparés par digestion à la pepsine selon la procédure standard, plutôt que les anticorps complets qui ont été adsorbés dans les microplaques. La concentration d'adsorption des fragments F(ab')₂ était de 50 ou 100 $\mu\text{g/ml}$. Des essais de stimulation avec des anticorps solubles ont aussi été tentés. A cet effet, les cellules à la concentration de 5×10^6 cellules/ml en suspension dans du milieu contenant 50 U/ml d'IL2 sont incubées avec 25 $\mu\text{g/ml}$ de l'anticorps à l'étude. Quelle que soit la nature des anticorps utilisés (solubles ou adsorbés, entiers ou fragments F(ab')₂), la période d'incubation des cellules LAK avec les anticorps est de 4 à 6 h à 37°C. Chaque échantillon est constitué d'une rangée complète de douze puits, ce qui correspond à un total de $2,4 \times 10^6$ cellules stimulées.

3.5.2 Méthode indirecte

Une méthode indirecte de stimulation des cellules LAK via le récepteur Ly49C a aussi été mise au point. Dans ce cas, les cellules à la concentration de $5 \times 10^6/\text{ml}$ sont incubées 30 min à 4°C soit avec l'AcM de souris 4LO3311 réagissant avec un épitope de la tige du récepteur Ly49C, l'AcM de souris SW5E6 ou l'AcM de hamster 5GA5 qui reconnaissent tous les deux des épitopes du domaine de liaison aux sucres (CRD, Carbohydrate Recognition Domain) communs aux récepteurs Ly49C et Ly49I. Ces anticorps sont utilisés à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS. Les cellules sont ensuite lavées et remises en suspension dans du RPMI 1640 contenant 10% de SFB (v/v) et 20 U/ml d'IL-2. Puis, elles sont distribuées dans des microplaques dans lesquelles ont

préalablement été adsorbés, dans les conditions décrites précédemment, des fragments $F(ab')_2$ d'IgG de chèvre dirigés contre les chaînes lourdes et légères des IgG de souris (GAM, Goat Anti-Mouse) ou de hamster (GAH, Goat Anti-Hamster). Dans les expériences dans lesquelles l'AcM 2.4G2 (IgG2b de rat anti-Fc γ RII/Fc γ RIII) a été utilisé comme témoin positif, ce sont des fragments $F(ab')_2$ d'IgG de chèvre dirigés contre les chaînes lourdes et légères des IgG de rat (GAR, Goat Anti-Rat) qui ont été adsorbés dans les puits de la microplaque destinés à recevoir les cellules incubées avec cet anticorps. La durée et les conditions de l'incubation des cellules avec les anticorps adsorbés sont identiques à celles décrites à la section précédente.

3.6 Mesure de l'ARN messager de cytokines dans les cellules stimulées

L'effet de la stimulation des cellules LAK via le récepteur Ly49C a été évalué par la mesure du taux d'ARN messager (ARNm) de cytokines produites par les cellules LAK activées. Deux méthodes ont été utilisées soit l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) après synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à l'aide de la transcriptase inverse (RT) et ce dans un contexte compétitif (méthode décrite à la section 3.6.3) et le buvardage de type Northern après électrophorèse (méthode décrite à la section 3.6.4). Les deux méthodes requéraient que les ARN totaux soient d'abord extraits des échantillons de cellules stimulées.

3.6.1 Préparation des lysats cellulaires

Les cellules NK enrichies, cultivées 6 à 8 jours en présence d'IL-2 dans les conditions décrites à la section 3.3 puis stimulées dans l'une ou l'autre des conditions exposées à la section 3.5, ont été lysées avec le réactif TRIzol[®]LS (GIBCO BRL). A cet effet, les cellules en suspension dans les surnageants des 12 puits de chaque échantillon sont d'abord collectées dans un tube puis 65 μ l de TRIzol[®]LS est immédiatement ajouté à chaque puit pour lyser les cellules qui sont restées attachées au fond des puits. Les cellules présentes dans les surnageants collectés préalablement sont centrifugées et remises en suspension dans 250 μ l de RPMI 1640 contenant 10% de SFB (v/v). Le lysat

est alors repris de chaque puits, ajouté au tube contenant les cellules et le tout est soigneusement mélangé. Cette procédure assure une récupération optimale des ARN totaux des cellules stimulées tout en respectant les recommandations du manufacturier, soit l'utilisation de trois volumes de TRIzol[®]LS par volume d'échantillon. Les lysats cellulaires ainsi obtenus sont congelés à -70°C jusqu'à utilisation.

3.6.2 Extraction des ARNs totaux

Pour extraire les ARNs, 200 μl de chloroforme sont ajoutés aux lysats cellulaires décongelés. Après 15 sec d'agitation vigoureuse, les tubes sont laissés au repos pour 10 min puis centrifugés à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C . La phase supérieure (aqueuse) des lysats, qui contient l'ARN, est prélevée, transférée dans un nouveau tube et l'ARN est précipité avec 500 μl d'isopropanol. Après une agitation de quelques secondes au vortex, les tubes sont incubés 30 min à la température de la pièce, puis centrifugés de nouveau à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C . Après avoir éliminé le surnageant et asséché délicatement les parois du tube, le culot d'ARN est lavé avec 1 ml d'éthanol à 75% (v/v) dilué dans de l'eau déionisée stérile puis centrifugé à 7 500 x g pendant 5 min à 4°C . Le surnageant est de nouveau éliminé et les parois du tube asséchées comme à l'étape précédente. Le culot d'ARN est repris dans 30 μl d'eau déionisée stérile et incubé 5 à 10 min à 60°C . L'ARN obtenu est dosé au spectrophotomètre par la mesure de l'absorbance à 260 nm considérant qu'une unité d'absorbance correspond à une concentration de 40 μg d'ARN/ml (Sambrook *et al.*, 1989). La pureté de l'échantillon est calculée en faisant le ratio des absorbances à 260 et 280 nm. Les échantillons d'ARN sont conservés à -70°C jusqu'à utilisation.

3.6.3 Mesure des taux d'ARNm spécifiques par RT-PCR quantitatif et compétitif

Il est possible de mesurer la concentration intracellulaire d'ARNm spécifiques par PCR suite à la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN total cellulaire. La trousse MIMIC[™] (CLONTECH Laboratories Inc. Palo Alto, CA, USA) nous a permis de construire des molécules servant de standards internes pouvant être amplifiées par les mêmes amorces

que celles choisies pour les séquences cibles. L'amplification simultanée de la séquence standard et de la séquence cible donne lieu au phénomène de compétition qui permet alors la quantification des ARNm spécifiques par l'analyse de l'intensité des bandes visualisées après coloration d'un gel d'agarose avec du bromure d'éthidium (EtBr, Sigma Chemical).

3.6.3.1 Choix des amorces spécifiques

Les amorces utilisées pour l'amplification spécifique de séquences correspondant à celles des ARNm du TNF- α , de l'IFN- γ et du GM-CSF murins ont été choisies à l'aide des logiciels Gene Works[©] (IntelliGenetics Inc., Mountain View, CA, USA) et Oligo 5,0[©] (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO, USA). Les critères de sélection des amorces spécifiques sont les suivants: la séquence amplifiée doit être contenue dans la séquence codante pour chacun des ARNm, la séquence génomique correspondante doit contenir au moins un intron, les amorces doivent avoir près de 20 nucléotides de longueur et également contenir un pourcentage élevé de nucléotides de type guanine (G) et cytosine (C). Ces deux types de nucléotides formant entre eux des liaisons à trois ponts hydrogène, ils contribuent à augmenter la stabilité de la liaison entre l'amorce et la séquence cible à amplifier. En outre, les amorces spécifiques ne doivent pas s'hybrider entre elles, former des structures secondaires en se repliant sur elles-mêmes ni pouvoir s'hybrider à un autre endroit dans la séquence de l'ARNm concerné. Elles doivent enfin avoir des températures d'hybridation et de dénaturation optimales. Les séquences codantes des trois ARNm trouvées dans la banque de données du National Center of Biotechnology Information (NCBI Gene Bank, numéros d'accès: M13049 pour TNF- α , K00083 pour IFN- γ et X03221 pour GM-CSF) ont donc été retranscrites puis soumises à l'analyse par les deux logiciels afin d'identifier les meilleures amorces possibles selon les critères énumérés précédemment. Chaque paire d'amorces sélectionnée par un des logiciels a été analysée avec l'autre logiciel et notre choix s'est arrêté sur les paires d'amorces les mieux classées par les deux. Les amorces sélectionnées sont identifiées dans le Tableau II.

ARNm	Amorce	Longueur	Séquence nucléotidique
TNF- α	amorce 1	20 mer	5'-CAGCTTCTTCTCATTCTGC-3'
	amorce 2	20 mer	5'-GACAAGGTACAACCCATGGG-3'
IFN- γ	amorce 1	20 mer	5'-CAAGTGGCATAGATGTGGAA-3'
	amorce 2	18 mer	5'-CTGGACCTGTGGGTGTT-3'
GM-CSF	amorce 1	21 mer	5'-AGAAAGGCTAAGGTCCTGAGG-3'
	amorce 2	20 mer	5'-CTGGCTGTCATGTTCAAGGC-3'

Tableau II. Séquence nucléotidique des amorces spécifiques utilisées pour l'amplification des ADNc correspondant aux ARNm du TNF- α , de l'IFN- γ et du GM-CSF.

Utilisant le moteur de recherche BLAST sur le site internet du NCBI, nous nous sommes aussi assurés que les amorces sélectionnées ne pouvaient amplifier aucune autre séquence connue du génome murin. Nous avons également demandé l'avis d'un expert en PCR, le Dr Peter Tijssen (INRS-Institut Armand-Frappier), qui nous a confirmé la pertinence de nos choix. Les amorces ont été synthétisées par le Service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier dirigé par le Dr François Sharek. Les longueurs des fragments amplifiés par ces trois paires d'amorces sont respectivement de 313, 266 et 311 paires de bases (pb).

3.6.3.2 Construction des standards internes

Afin de pouvoir quantifier les ARNm spécifiques à chacune des trois cytokines, la réaction de PCR doit se faire dans un contexte de compétition pour les amorces spécifiques entre la séquence cible (concentration inconnue) et une séquence servant de standard interne (concentration connue) pouvant être amplifiée par les mêmes amorces. Les séquences servant de standard interne pour l'amplification des trois différentes séquences cibles ont été construites à l'aide de la trousse PCR MIMIC™ (CLONTECH Laboratories Inc.) en suivant les recommandations du manufacturier. D'abord, nous avons dû identifier, à l'intérieur de la molécule de base fournie avec la trousse, une séquence dont la longueur était supérieure ou inférieure d'environ 10% à celle de la séquence cible amplifiée par les amorces spécifiques, et ce, afin de rendre plus équitable la compétition entre la séquence cible et la séquence standard. Les séquences que nous avons sélectionnées pour servir de standard interne lors de l'amplification du TNF- α , de l'IFN- γ et du GM-CSF étaient respectivement de 340, 288 et 341 bp. Pour obtenir des molécules standards dont les extrémités correspondent à la séquence complémentaire des amorces spécifiques pour chacun des trois ARNm, nous avons fait synthétiser trois nouvelles paires d'amorces (amorces longues). Celles-ci pouvaient s'hybrider à l'endroit choisi dans la molécule de base et portaient également la séquence correspondante de chacune des trois paires d'amorces utilisées pour l'amplification des ARNm des trois cytokines. L'amplification de la molécule de base en présence de ces trois paires

d'amorces longues a été effectuée en réglant les paramètres de la réaction selon les recommandations du manufacturier.

3.6.3.3 Synthèse des ADNc et amplification

Après que la synthèse des amorces spécifiques et des molécules standards eut été complétée, nous pouvions procéder à la détermination des taux d'ARNm spécifiques au TNF- α , à l'IFN- γ et au GM-CSF dans les ARNs totaux obtenus à partir d'échantillons de cellules stimulées de différentes façons (voir section 3.5). La synthèse des ADNc est effectuée dans un mélange réactionnel de 25 μ l contenant 500 ng d'ARN, 1,0 μ l de poly (dT), 0,5 μ l de chaque dNTP (déoxynucléotides tri-phosphate: dATP, dCTP, dTTP et dGTP), 1,0 μ l de RNA guard[®] Ribonuclease Inhibitor, 2,5 μ l de tampon de réaction 10X (500 mM de Tris à pH 8,0, 625 mM de KCl, 30 mM de MgCl₂, 100 mM de DTT) et 50 U de RT provenant du virus leucémique murin de Moloney (tous de Pharmacia Biotech). Les tubes sont incubés à 37°C pour 90 min, la réaction étant stoppée par transfert des tubes à 4°C.

Les ADNc synthétisés sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide de l'ADN polymérase de *Thermophilus aquaticus* (Taq DNA polymérase, Pharmacia Biotech). Cinq tubes de PCR de 0,5 ml sont préparés pour chaque échantillon. Un volume de 30 μ l d'un premier mélange de réactifs contenant (par échantillon) 2,5 μ l de chaque dNTP, 5,0 μ l d'une dilution (20 pmol/ μ l) de chacune des amorces spécifiques, 25 μ l de tampon de dilution 10X pour la Taq ADN polymérase (Pharmacia Biotech) et 105 μ l d'eau déionisée stérile est d'abord réparti dans chacun des tubes. A la surface de ce premier mélange, on ajoute 30 μ l de n-hexadécane (ICN Canada, Montréal, Québec) et les tubes sont transférés sur glace pour permettre la solidification du produit ajouté. Une solution contenant 2 U d'ADN polymérase dans 14 μ l d'eau déionisée stérile est ensuite ajoutée à chacun des tubes par dessus le n-hexadécane solide. À chacun des 5 tubes d'un même échantillon sont ajoutés 4,0 μ l de la solution d'ADNc et 2,0 μ l de l'une des 5 dilutions (1:2) de la molécule standard. Tous les tubes sont centrifugés brièvement et placés dans un appareil à PCR. La réaction de polymérisation en chaîne est effectuée selon les paramètres suivants :

- Cycle 1 : dénaturation de 2 min à 95°C
- Cycle 2-32 : dénaturation de 30 sec à 95°C, appariement de 1 min à 58°C, polymérisation de 1 min à 72°C
- Cycle 33 : 7 min à 72°C

3.6.3.4 Électrophorèse en gel d'agarose et analyse

Les échantillons sont mélangés dans un rapport de 5:1 au tampon de chargement contenant 15% de Ficoll type 400 (v/v), 0,25% (p/v) de bleu de bromophénol, 0,25% (v/v) de xylène cyanol, déposés dans un gel d'agarose (ICN) à 2% (p/v) dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA, Sambrook *et al.*, 1989) et soumis à une électrophorèse dans un appareil de type Wide Mini-sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario), en utilisant comme marqueur de taille le 1 Kb DNA Ladder (GIBCO BRL). Le gel est ensuite immergé dans une solution de 0,5 mg/ml d'EtBr dans de l'eau déionisée, incubé environ 10 min sous légère agitation puis rincé dans un récipient contenant de l'eau déionisée. Le gel est photographié sous illumination ultraviolette.

Chaque échantillon présente deux bandes qui correspondent aux produits d'amplification de la séquence cible et de la molécule standard. L'image obtenue est analysée par densitométrie à l'aide du logiciel Molecular Analyst™ (Bio-Rad) qui transforme en valeur numérique la luminosité des bandes observées. Les ratios de la valeur de luminosité de la bande correspondant au produit amplifié de la séquence cible sur celle de la bande correspondant au produit amplifié de la séquence servant de standard interne pour chacun des cinq tubes d'un même échantillon sont portés sur un graphique en fonction du logarithme en base 10 de la concentration de la molécule standard. La courbe de régression linéaire établie à partir de ces données permet de calculer la concentration de départ (avant amplification) de la molécule cible qui, sur la droite tracée, correspond en fait à la valeur de concentration pour un rapport séquence cible/séquence standard égal à 1. En assumant que 100% des ARNm présents dans les dilutions d'ARN de départ ont été transformés en ADNc par la RT, la concentration de la molécule cible calculée à partir de l'équation de la régression linéaire reflète la proportion relative d'ARNm spécifique

par rapport à une quantité fixe d'ARN total dans les lysats cellulaires. Les valeurs obtenues pour les différents échantillons constituent la base de comparaison de l'effet des différents protocoles de stimulation des cellules LAK via le récepteur Ly49C. Un exemple d'analyse et de quantification des ARNm spécifiques à partir d'un gel d'agarose est présenté à la Figure 3.

3.6.4 Mesure des taux d'ARNm spécifiques par buvardage de type Northern

La méthode du buvardage de type Northern a également été utilisée dans le présent projet de maîtrise pour la mesure de la concentration des ARNm spécifiques au TNF- α et à l'IFN- γ . Cette méthode requiert que l'ARN extrait des cellules stimulées soit d'abord dénaturé, soumis à l'électrophorèse et au transfert sur membrane de nylon. L'ARN est ensuite hybridé avec une sonde d'ADN radiomarquée, purifiée à partir d'un plasmide et reconnaissant spécifiquement les ARNm de ces cytokines.

3.6.4.1 Culture des bactéries

Les bactéries *Escherichia coli* (*E.coli*) de souche HB 101 transfectées avec le plasmide pBR322 contenant la séquence complémentaire de l'ARNm du TNF- α (construction pMuTNF, ATCC) ou de l'IFN- γ (construction pms-10, ATCC) sont mises en culture selon les recommandations du fournisseur, dans du milieu LB (1% (p/v) de bacto-tryptone, 0,5% (p/v) d'extrait de levure et 1% (p/v) de NaCl, Sambrook *et al.*, 1989) additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline pour la bactérie portant la construction pMuTNF ou 15 μ g/ml de tétracycline pour la bactérie portant la construction pms-10. Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation constante dans 500 ml de milieu de culture jusqu'à l'obtention d'une mesure de turbidité (absorbance de la suspension à 600 nm) égale à 1.

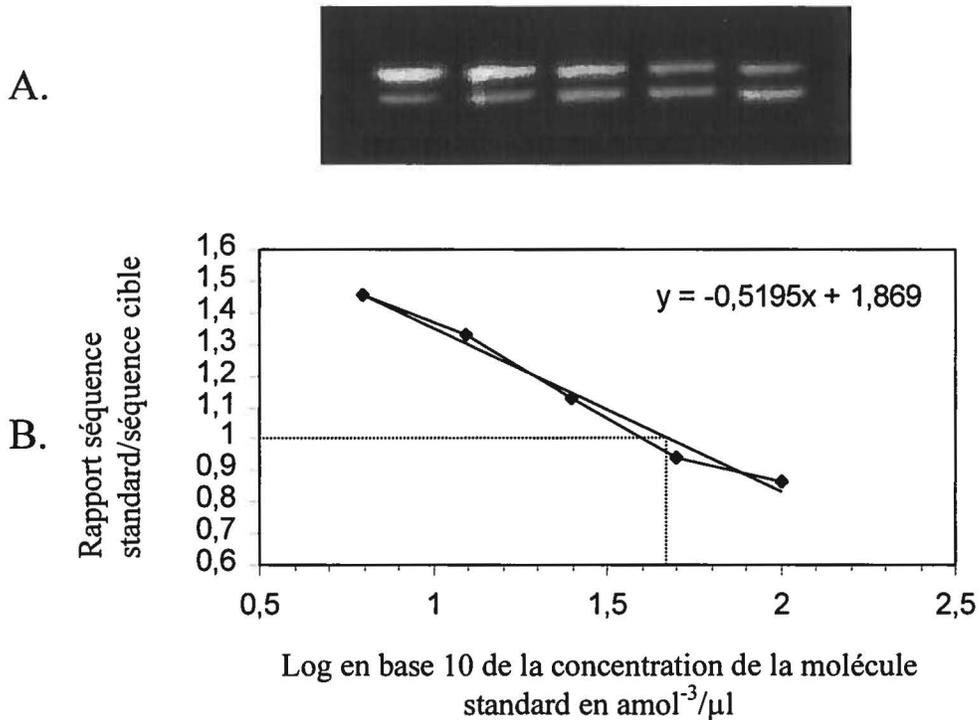


Figure 3. Exemple de quantification des ARNm spécifiques.

A. Photographie sous illumination ultraviolette d'un gel d'agarose coloré à l'EtBr. La bande supérieure correspond à la séquence standard et la bande inférieure à la séquence cible.

B. Graphique du rapport de densité des bandes (séquence standard/séquence cible) en fonction du logarithme en base 10 de la concentration de départ de la molécule standard. À partir du graphique obtenu, une régression linéaire est tracée et la concentration des ARNm spécifiques est calculée à partir de l'équation de la droite pour un rapport de densité égal à 1.

3.6.4.2 Purification des plasmides et des inserts plasmidiques

Les plasmides pBR-322 contenant les inserts correspondants à chacune des deux sondes utilisées pour le buvardage de type Northern sont purifiés à l'aide de la trousse Maxi-Prep de QIAGEN (Santa Clarita, CA, USA), selon le protocole fourni avec la trousse. Les plasmides purifiés sont ensuite digérés pendant 2 h et 30 min à 37°C par l'enzyme Pst1 (Gibco BRL) à raison de 40 U d'enzyme par 5 µg de plasmide. Les inserts plasmidiques contenant la séquence complémentaire des ARNm spécifiques du TNF-α et de l'IFN-γ libérés par la digestion sont par la suite purifiés à l'aide de la trousse GENECLEAN (Bio 101, Vista, CA, USA) en utilisant encore une fois le protocole fourni par le manufacturier.

3.6.4.3 Électrophorèse, transfert et fixation des ARNs

Un à trois µg d'ARN total extrait de cellules stimulées sont d'abord dénaturés par incubation de 1 h à 50°C dans 25 µl de tampon NaHPO₄ 10 mM à pH 7,0 contenant 4,5 µl de glyoxal déionisé 40% (v/v) puis refroidis sur glace pendant 10 min. Après addition aux échantillons d'ARN dénaturés de 5 µl de tampon de chargement contenant 50% (v/v) de glycérol, 0,05% (p/v) de bleu de bromophénol et 0,6 µg/µl d'EtBr dans du tampon NaHPO₄ 10 mM à pH 7,0, ceux-ci sont soumis à l'électrophorèse dans un gel d'agarose (ICN) à 1% (p/v) dans le même tampon sans EtBr. Après migration, le gel est photographié sous illumination U.V. pour vérifier l'intégrité des ARNs. Ceux-ci sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Amersham Canada, Oakville, Ontario) pendant toute la nuit en utilisant du tampon SSC 20X (Sambrook *et al.*, 1989) comme solution de transfert.

La membrane de nylon est ensuite exposée aux rayons U.V. dans un appareil "GS Gene Linker" (BioRad) en utilisant un programme préenregistré dans l'appareil, puis incubée à 80°C 2 h dans un four à hybridation (Fisher Scientific) pour y fixer l'ARN. Afin d'éliminer le glyoxal résiduel, la membrane est placée dans du tampon Tris-HCl 20 mM, à pH 8,0 bouillant qu'on laisse ensuite refroidir à la température de la pièce.

3.6.4.4 Hybridation

La membrane est transférée dans du tampon SSC 20X, roulée et insérée dans une bouteille à hybridation. Un volume de 15 ml de solution de préhybridation (SSC 6X, 1% (p/v) de SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé 10 min à 95°C, tampon de Denhardt¹ 5X) préchauffée à 68°C est ensuite versée dans la bouteille qui est alors placée dans le four à hybridation pour une incubation de 3 à 4 h à 68°C.

Les sondes purifiées à partir des constructions plasmidiques pMuTNF (TNF- α murin) et pms-10 (IFN- γ murin) sont diluées de façon à obtenir environ 20 ng d'ADN dans 30 µl d'eau déionisée stérile et sont ensuite dénaturées à 95-100°C pendant 5 min. Par la suite, 10 µl de tampon OLB² (oligonucleotides labelling buffer) sont ajoutés ainsi que 2 µl de SAB à 10 mg/ml et 0,5 µl de Klenow (fragment large de l'ADN polymérase I, GIBCO BRL) à 4 U/µl. Le mélange est placé dans une boîte de plexiglas derrière un écran avant l'ajout de 7 µl de [α -³²P] dCTP (Amersham). La réaction d'élongation et d'incorporation du dCTP radiomarqué se poursuit ainsi pendant 4 à 5 h à la température de la pièce. Pour inactiver l'activité enzymatique de la Klenow, 150 µl de tampon STE (Tris-EDTA-NaCl, voir Sambrook *et al.*, 1989) sont ajoutés à la préparation de la sonde. Afin d'éliminer les nucléotides non incorporés, la sonde est ensuite filtrée par centrifugation dans une colonne de Séphadex G-50 (Pharmacia Biotech) prééquilibrée avec du tampon STE. L'éluat est ensuite recueilli dans un microtube de 1,5 ml, transféré dans un nouveau tube et dénaturé pendant 10 minutes à 95-100°C dans un bloc chauffant. Enfin, la sonde dénaturée est incorporée à 5 ml de tampon d'hybridation (SSC 6X, 0,5% (p/v) de SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé 10 min à 95-100°C, tampon Denhardt 1X) qui est ensuite versé dans la bouteille d'hybridation après avoir évacué le tampon de préhybridation. La bouteille est replacée dans le four à hybridation pour toute la nuit à 68°C.

¹Tampon Denhardt 50X: Ficoll-polyvinylpyrrolidone-SAB, voir Sambrook *et al.* (1989)

²Tampon OLB: 1:2,5:1,5 solutions A-B-C

Solution A: 1,25 M Tris, 125 mM MgCl₂ à pH 8,0, 0,25 M b-mercaptoéthanol, 0,5 mM dATP, dGTP, dTTP

Solution B: 2,0 M HEPES à pH 6,6

Solution C: 90 D.O./ml hexanucléotides (pd (N6), Pharmacia Biotech)

Après avoir évacué le tampon d'hybridation, la membrane est lavée directement dans la bouteille par l'ajout de 50 ml de tampon SSC 2X et une incubation de 5 min dans le four à hybridation toujours à 68°C. La membrane est ensuite lavée 5 fois supplémentaires dans le four (15 min par lavage) après l'ajout de 50 ml de tampon SSC 1X, 0,1% de SDS (2 fois), 50 ml de tampon SSC 0,1X, 0,1% de SDS (2 fois) et 100 ml de tampon SSC 0,1X, 0,1% de SDS respectivement. Pour ces lavages, tous les tampons sont préchauffés à 68°C. Finalement, la membrane est placée dans une cassette d'exposition munie d'un écran intensifiant et un film Kodak est inséré dans la cassette pour être exposé à -70°C pour une durée variable avant d'être révélée à l'aide d'un développeur automatique (AFP Imaging, modèle Mini-Med 90).

3.7 Phosphorylation sur tyrosine des protéines cellulaires

La transmission d'un signal d'activation à partir d'un récepteur de surface se manifeste dans plusieurs cas par une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines cellulaires. Ce phénomène peut être mis en évidence par immunobuvardage avec un AcM anti-phosphotyrosine après la stimulation et la lyse des cellules. Ainsi, nous avons stimulé des cellules LAK de souris BALB/c en utilisant les AcM déjà décrits (section 3.1) et nous avons analysé les lysats de ces cellules par immunobuvardage. Un autre type de stimulation cellulaire a été élaboré pour ces expériences.

3.7.1 Stimulation des cellules

Des cellules LAK incubées sans IL-2 dans les conditions décrites à la section 3.5.1 sont remises en suspension dans du HBSS contenant 10% (v/v) de SFB et réparties dans des microtubes à raison de 1×10^6 cellules par tube. L'échantillon servant de témoin positif de la phosphorylation sur tyrosine est centrifugé quelques secondes à très haute vitesse dans une microcentrifugeuse de table et resuspendu dans 50 μ l de HBSS (GIBCO BRL) contenant 0,1 mM de pervanadate de sodium (0,03% (v/v) de H₂O₂, 0,1 mM de NaVO₄), puis incubé pendant 5 min à 37°C dans un bloc chauffant. Les autres échantillons sont stimulés avec des AcM dirigés contre les récepteurs à l'étude. Pour la

stimulation par les AcM, les cellules sont également centrifugées et remises dans 50 µl de milieu HBSS contenant 5,0 µg d'AcM couplé à la biotine et sont incubées sur glace pendant 5 à 15 min. Par la suite, les cellules sont centrifugées quelques secondes à très haute vitesse, resuspendues dans 50 µl de milieu contenant 15 µg d'avidine (Boehringer Mannheim) et transférées à 37°C dans un bloc chauffant pour une durée variable. Après une nouvelle centrifugation rapide, le surnageant est décanté, puis les cellules sont transférées sur glace et lysées avec 10-20 µl de tampon de lyse contenant 1 mM de MgCl₂, 1 mM d'EGTA (EthyleneGlycol-β-aminoethyl ether-Tetraacetic Acid), 50 mM de NaF (fluorure de sodium, Sigma Chemical), 1 mM de Na₄P₂O₇ (Sigma Chemical), 1 mM de NaVO₄ (Sigma Chemical), 1 mM de Pefabloc[®] SC (Boehringer Mannheim), 10 µg/ml d'aprotinine (Boehringer Mannheim), 10 µg/ml de leupeptine (Boehringer Mannheim) et 1 µg/ml de pepstatine (Boehringer Mannheim) dans du tampon Tris-HCl 20 mM à pH 7,5 contenant 150 mM de NaCl et 1% (v/v) de NP-40. Des tentatives de stimulation indirecte avec des fragments F(ab')₂ des anticorps GAM et GAR ont également été faites. Pour ces stimulations, les cellules sont remises dans 50 µl de milieu contenant 5,0 µg de fragments F(ab')₂ de ces anticorps après l'incubation sur glace avec des AcM non couplés à la biotine puis la suspension est incubée sur glace à nouveau et transférée à 37°C. Peu importe le protocole de stimulation utilisé, le lysat est ensuite passé au vortex et incubé pour un minimum de 20 min sur glace avant d'être centrifugé à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse pendant 10 min à 4°C. Une quantité égale de tampon d'échantillon (62,5 mM de Tris à pH 6,8, 10% (v/v) de glycerol, 2% (p/v) de SDS et 0,01% (p/v) de bleu de bromophénol) contenant 100 mM de DTT (dithiothréitol) comme agent réducteur est alors ajoutée au lysat cellulaire et le tout est placé dans de l'eau bouillante pour 5 min. Les lysats sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Pour les expériences d'immunoprécipitations (section 3.8.3), un protocole de stimulation semblable a été utilisé. Ainsi, des cellules LAK de souris BALB/c ou C57BL/6 sont réparties en échantillons de 5×10^6 à 1×10^7 cellules dans des tubes de 1,5 ml avant d'être centrifugées rapidement et resuspendues dans 50 µl de milieu RPMI 1640. L'échantillon servant de témoin positif est stimulé dans ce cas-ci avec 1 mM de pervanadate pendant 15 min à 37°C. Les autres échantillons sont incubés avec 5 à 10 µg

d'AcM dirigé contre le récepteur à l'étude pendant 10 min sur glace dans un volume de 50 µl de milieu. Les cellules sont ensuite centrifugées et réincubées 5 min avec 5 à 10 µg d'anticorps GAM ou GAR ou avec la même quantité de fragments F(ab')₂. Finalement, les cellules sont transférées à 37°C pendant 1 à 2 min dans un bloc chauffant avant d'être lysées sur glace par l'ajout de 500 µl de tampon de lyse. Pour les échantillons de cellules non stimulées ou stimulées avec le pervanadate, une quantité équivalente d'AcM (5 à 10 µg) est ajoutée après le tampon de lyse.

3.7.2 Analyse par immunobuvardage ou buvardage de type Western

Les protéines du lysat cellulaire sont d'abord soumises à l'électrophorèse en conditions réductrices dans un gel de polyacrylamide de 8 ou 10% (p/v) à l'aide d'un appareil « Mini Protean » (Bio-Rad). Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose avec un appareil de transfert « semi-dry » et leur intégrité est vérifiée par une coloration non permanente au rouge Ponceau (Sigma Chemical). La membrane est par la suite placée dans une solution de blocage contenant 5% (p/v) de SAB (Sigma Chemical) et 1% (v/v) de Tween 20 (Sigma Chemical) dans du tampon TBS (Tris buffered saline : 10 mM de Tris à pH 8,0, 150 mM de NaCl) pour toute la nuit à 4°C sur une plaque agitatrice. Une solution d'hybridation de composition identique à la solution de blocage (TBS-T 5% SAB) contenant en plus un anticorps dirigé contre la molécule à l'étude est ensuite versée sur la membrane qui est incubée pendant 1 h à 4°C avec agitation. Pour l'analyse de la phosphorylation des protéines, l'AcM 4G10 (IgG2b de souris) reconnaissant spécifiquement les phosphotyrosines est utilisé pour l'hybridation de la membrane. Après l'hybridation, la membrane est lavée quatre fois avec du tampon TBS contenant 1% de Tween 20[®] (TBS-T) mais sans SAB, un minimum de 10 min étant compté pour chaque lavage. Après quoi, la membrane est incubée pour 1 h à 4°C avec une solution de TBS-T 5% SAB contenant des anticorps de chèvre anti-IgG de souris et couplés à la peroxidase de raifort (HRP, horseradish peroxidase). Une fois l'incubation terminée, quatre lavages supplémentaires sont effectués avec du tampon TBS-T et la membrane est recouverte pendant 1 min à la température de la pièce avec le mélange des deux réactifs fournis avec la trousse de détection en chemiluminescence

ECL de la compagnie Amersham. La membrane est finalement placée dans une pellicule de plastique et insérée dans une cassette d'exposition, dans laquelle un film Kodak est exposé pour des durées variables (quelques sec à quelques min).

3.8 Protéines cytoplasmiques associées aux récepteurs Ly-49

Encore une fois, deux types d'analyses ont été utilisées pour la détection des protéines cytoplasmiques associées aux récepteurs Ly49, soit l'analyse par buvardage de type Far Western (section 3.8.2) et l'analyse par immunoprécipitation (section 3.8.3).

3.8.1 Expression et purification des protéines de fusion

Pour l'analyse par buvardage de type Far Western, les protéines cytoplasmiques associées aux récepteurs Ly49 sont détectées par l'hybridation d'un lysat de cellules RNK-16 (ATCC) purifié avec une protéine de fusion contenant le domaine intracytoplasmique du récepteur Ly49 à l'étude en utilisant comme sonde la même protéine de fusion radiomarquée au ^{32}P . Cette méthode implique la production et la purification des protéines fusion à partir de transfectants bactériens.

Tous les clonages nécessaires à cette partie du projet ont été préalablement réalisés par Nadia Bonvouloir dans le laboratoire du Dr Pascale Duplay. En bref, des séquences codant le segment intracellulaire des récepteurs Ly49A, Ly49C, Ly49G2 ou Ly49H sont amplifiées par PCR et sont insérées dans le plasmide pGEX-2TK (Pharmacia Biotech, voir carte génomique du plasmide, Annexe 1) à l'aide de l'enzyme de restriction BamH 1 (New England Biolabs, Mississauga, Ontario) dans un site situé en aval des séquences codantes pour la glutathion-S-transférase et pour un site de phosphorylation de la kinase bovine du muscle cardiaque (HMK, Heart Muscle Kinase). Les différentes constructions contenant les séquences codantes pour le domaine intracytoplasmique des quatre récepteurs Ly49 sont ensuite transfectées dans des bactéries *E. Coli* de souche DH5 α (GIBCO BRL) et TKX1 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Ces cellules avaient

préalablement été rendues compétentes pour la transfection selon le protocole décrit par Nishimura *et al.*(1990).

La transfection de ces bactéries est effectuée par choc thermique de 60 sec à 42°C. Par la suite, les cellules sont transférées sur glace et diluées 1:10 dans du milieu SOC (bacto-tryptone, extrait de levure, NaCl, KCl, glucose, voir Sambrook *et al.*, 1989) avant d'être remises en culture pour 1 h afin de permettre l'expression du gène de résistance à l'ampicilline porté par le plasmide pGEX-2TK. Les transfectants sont sélectionnés à partir d'une colonie isolée après deux étalements successifs sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB (0,7 % (p/v) d'agarose, 100 µg/ml d'ampicilline).

Les bactéries transfectées avec le plasmide pGEX-2TK contenant des insertions codantes pour les domaines intracytoplasmiques des récepteurs Ly49A, C, G2 et H sont mises en culture dans du milieu LB (souche DH5α) ou dans du milieu 2X YT pour la souche TKX1 (bacto-tryptone, extrait de levure, NaCl, Sambrook *et al.*, 1989) en présence de 100 µg/ml d'ampicilline pour la nuit. Une dilution 1:50 de ces cultures est ensuite incubée jusqu'à ce que la mesure de turbidité à 600 nm indique une densité optique d'environ 1,0. L'expression des protéines de fusion est alors induite par l'ajout de 0,1 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG, GIBCO BRL) et la culture est poursuivie pendant 2 à 3 h. Comme les séquences codantes des domaines intracytoplasmiques des récepteurs Ly49 sont insérées dans le cadre de lecture ouvert de la glutathion-S-transférase (GST) et du site de phosphorylation de la HMK, les protéines de fusion produites par les bactéries transfectées contiennent la séquence en acides aminés correspondant à ces trois éléments.

Pour la purification de ces protéines de fusion, les cellules DH5α sont concentrées 20X dans du PBS froid. Les cellules ont ainsi pu être conservées à -20°C jusqu'à utilisation. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication et l'extrait ainsi obtenu est centrifugé à 2200 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est ensuite transféré sur des billes de Sépharose®4B-glutathion (Pharmacia Biotech, 50 µl de billes/ml d'extrait) et incubé 1 h à 4°C sur roue. Les billes sont ensuite lavées 4 fois avec du PBS froid et les

protéines qui y sont adsorbées sont éluées pendant 10 min à 4°C sur roue par l'ajout de 100 µl d'une solution de glutathion (forme réduite, Sigma Chemical) à 20 mM dans du tampon contenant 100 mM de NaCl et 100 mM de Tris à pH 8,0. Après élimination des billes de Sépharose par centrifugation, l'éluat est mélangé à 100 µl de tampon d'échantillon 2X (62,5 mM de Tris à pH 6,8, 10% (v/v) de glycerol, 2% (p/v) de SDS et 0,01% (p/v) de bleu de bromophénol) contenant 100 mM de DTT comme agent réducteur. L'éluat réduit est conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

En ce qui concerne la souche bactérienne TKX1, une étape supplémentaire a dû être effectuée avant la purification des protéines de fusion. En effet, cette souche exprime la tyrosine kinase ELK dont le gène est placé sous le contrôle de l'opéron tryptophane. Il a donc fallu procéder à l'induction de la phosphorylation sur tyrosine des protéines cellulaires après l'induction de l'expression des protéines de fusion. Pour ce faire, les cellules sont resuspendues de façon à obtenir une densité optique à 600 nm d'environ 1,0 dans du milieu ne contenant pas de tryptophane et permettant l'expression du gène de la kinase ELK (milieu TK; 3,0% (p/v) de Na₂HPO₄, 1,5% (p/v) de KH₂PO₄, 0,5% (p/v) de NH₄Cl, 0,25% (p/v) de NaCl, 0,0015% (p/v) de CaCl₂) et sont remises en culture pour une heure à 30°C avant d'être centrifugées à nouveau et concentrées 20X dans du PBS froid contenant 1 mM d'orthovanadate de sodium (NaVO₄, Sigma Chemical). La purification des protéines de fusion phosphorylées sur tyrosine a ensuite été effectuée comme dans le cas des bactéries DH5α. Dans les deux cas, la purification des protéines de fusion a été vérifiée sur gel de polyacrylamide à 8% après coloration au bleu de Coomassie.

3.8.2 Buvardage de type Far Western

Avant d'entreprendre la buvardage de type Far Western proprement dit, des cellules RNK-16 (obtenues du Dr C.W. Reynolds, National Cancer Institute, Frederick, MD, USA) ont été mises en culture dans du milieu RPMI 1640 contenant 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v) de pyruvate de sodium, 1% (v/v) d'une solution d'acides aminés non-essentiels, 200 mM de L-glutamine et 5 x 10⁻⁵ M de β-2-mercaptoéthanol. Ces cellules

sont lysées dans du tampon de lyse (voir composition à la section 3.7.2), puis passées au vortex et incubées sur glace pendant 20 min avant d'être centrifugées à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse à 4°C pour 10 min. Le lysat ainsi obtenu est incubé sur roue pendant 2 h à 4°C avec des quantités équivalentes de protéines de fusion adsorbées aux billes de Sépharose[®]-glutathion. Les billes de Sépharose[®] sont ensuite lavées quatre fois consécutives avec du tampon de lyse avant que les complexes protéines cellulaires-protéines de fusion soient élués par l'ajout de 100 µl d'une solution de glutathion à 20 mM. Les complexes protéiques ainsi élués sont ensuite mélangés dans un rapport de 1:1 avec du tampon d'échantillon 2X contenant du DTT.

Les protéines éluées du lysat cellulaire sont soumises à l'électrophorèse en conditions réductrices dans un gel de polyacrylamide à 10% (p/v), transférées sur une membrane de nitrocellulose et visualisée par une coloration non permanente au rouge Ponceau. Après vérification de la qualité des protéines transférées, la membrane est décolorée et les sites de fixation non spécifiques sont bloqués par l'ajout de 10 ml de solution HYB 75 (20 mM d'Hepes à pH 7,7, 75 mM de KCl, 0,1 mM d'EDTA, 2,5 mM de MgCl₂, 0,05% (v/v) de NP-40) contenant 1% (p/v) de lait Carnation et 25% (v/v) d'extrait de bactéries DH5α transfectées avec le plasmide pGEX-2TK sans insertion. Pour hybrider la membrane, la protéine de fusion choisie est purifiée tel que décrit précédemment et est radiomarquée au ³²P avant d'être élue des billes de Sépharose[®]-glutathion. À cet effet, la protéine de fusion est lavée quatre fois dans du PBS et une fois supplémentaire avec du tampon HMK 1X (tampon de réaction de la HMK, voir composition du tampon 10X) sans DTT. Par la suite, 5 µl de tampon HMK 10X (200 mM de Tris à pH 7,5, 1 M de NaCl, 120 mM de MgCl₂) avec DTT (10 mM) sont ajoutés directement sur le culot de billes auxquelles était adsorbée la protéine de fusion de même que 1,7 µl de HMK purifiée (10 U/µl, Sigma Chemical), 40 µl d'eau déionisée et 3,3 µl de [γ -³²P] ATP (Amersham). Le mélange est ainsi incubé sur roue pendant 30 min à 4°C avant l'ajout de 1 ml de tampon d'arrêt de la réaction de la HMK (10 mM de NaPO₄, 10 mM de pyrophosphate de sodium, 10 mM d'EDTA, 1 mg/ml de SAB). La protéine est ensuite lavée et élue avec une solution de glutathion à 20 mM. La protéine de fusion purifiée et radiomarquée au ³²P est alors mélangée dans 10 ml de tampon HYB 75

contenant 1% (p/v) de lait et cette solution est versée sur la membrane de nitrocellulose (après avoir évacué la solution de blocage) qui sera incubée toute la nuit à 4°C avec agitation. Par la suite, la membrane est lavée quatre fois avec du tampon HYB 75 contenant 1% (p/v) de lait et est placée dans une cassette d'exposition munie d'un écran intensifiant. Un film Kodak est inséré dans la cassette et est exposé pendant une durée variable. Le film est ensuite développé dans un développeur automatique et les protéines cellulaires capables de se lier à la protéine fusion sont visualisées.

Afin de vérifier si les protéines cellulaires associées aux protéines de fusion qui avaient été identifiées par buvardage de type Far Western étaient des protéines connues, nous avons entrepris d'analyser les mêmes échantillons par immunobuvardage en utilisant pour l'hybridation des anticorps dirigés contre les molécules choisies. Pour ce faire, les protéines cellulaires éluées après l'incubation du lysat avec les différentes protéines de fusion purifiées sont traitées tel que décrit à la section 3.7.2. Les anticorps utilisés pour l'hybridation dans ce cas-ci sont les anticorps polyclonaux de lapin anti-SHP-1 et anti-SHP-2. Pour la détection, un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la HRP est utilisé.

3.8.3 Immunoprécipitation

Les récepteurs Ly49 à l'étude sont immunoprécipités à partir de cellules LAK stimulées selon le protocole décrit à la section 3.7.1 et les immunoprécipités sont analysés par immunobuvardage pour la présence de phosphotyrosines avec l'AcM 4G10 (dans les récepteurs Ly49 et dans des protéines associées) et pour la présence de protéines cytoplasmiques associées avec les anticorps polyclonaux anti-SHP-1 et anti-SHP-2.

Le lysat cellulaire est clarifié par une incubation avec 10 µl (volume sec) de billes de Sépharose[®] CL-6B (Pharmacia Biotech) pendant 2 h sur roue à 4°C. Le lysat est ensuite centrifugé brièvement, transféré dans un nouveau tube contenant 10 µl (volume sec) de billes de protéine G-Sépharose[®] 4 fast flow (Pharmacia Biotech) et incubé de nouveau pour 2 h sur roue à 4°C. Le lysat est centrifugé et le surnageant correspondant

aux protéines cellulaires totales sans la protéine immunoprécipitée est prélevé et conservé à -20°C . Le culot de billes de protéine G-Sépharose[®] est lavé quatre fois avec 1 ml de tampon de lyse et quatre fois avec 1 ml de tampon de lyse ne contenant que 0,1% (v/v) du détergent NP-40. Après les lavages, 15 μl de tampon d'échantillon avec DTT sont ajoutés au culot de billes et celui-ci est bouilli pendant 5 min pour libérer les protéines immunoprécipitées. L'analyse de la phosphorylation sur tyrosine des récepteurs ainsi immunoprécipités est effectuée par immunobuvardage avec l'anticorps 4G10 dans un premier temps et avec les anticorps anti-SHP-1 et anti-SHP-2 dans un deuxième temps. Pour l'analyse avec l'AcM 4G10, la détection a été faite avec une solution de streptavidine-HRP (Amersham) étant donné que dans ce cas-ci, l'anticorps 4G10 était couplé à la biotine.

4. RÉSULTATS

4.1 Rendement de la procédure d'enrichissement des cellules NK et des cultures de cellules LAK

Les cellules NK utilisées au cours de ce projet de maîtrise ont été enrichies par sélection négative selon la procédure décrite à la section 3. Quelle que soit la souche de souris utilisée, les cellules recueillies en fin de parcours représentaient de 1,5 à 3% des leucocytes spléniques totaux, soit 1 à 3 x 10⁶ cellules/rate. Bien qu'avec certaines souches de souris il n'ait pas été possible d'évaluer la pureté de la préparation, nous pouvons au moins affirmer que dans le cas de la souris B6, les analyses par cytométrie en flux avec l'AcM PK136 ont révélé que 75 à 90% des cellules obtenues à la fin de la procédure d'enrichissement expriment NK1.1, un récepteur présent sur la majorité des cellules NK de cette souche. Les cellules LAK ont été utilisées après 6 à 8 jours de culture en présence d'IL-2. Le facteur de multiplication obtenu variait de 5 à 15X.

4.2 Analyse phénotypique des cellules NK utilisées dans le projet et sélection des souches de souris

Le phénotype des cellules recueillies au terme de la procédure d'enrichissement a été établi par des analyses de cytométrie en flux, après incubation avec des anticorps anti-récepteurs marqués à la biotine, la coloration des cellules positives étant révélée avec un conjugué SA-PE. Six AcM différents ont été utilisés pour la caractérisation: l'un était spécifique de NK1.1 et les autres reconnaissent des récepteurs Ly49. Nous illustrons d'abord les résultats obtenus avec les cellules NK de la souris BALB/c que nous comptons utiliser en raison de leur forte expression du récepteur à l'étude. Les histogrammes de la Figure 4 montrent en effet que plus de la moitié des cellules obtenues après enrichissement des cellules NK de la rate des souris de cette souche expriment le récepteur Ly49C et ce, à un niveau relativement élevé. Les deux anticorps utilisés soit 4LO3311 (IgG3 de souris anti-Ly49C) et SW5E6 (IgG2a de souris anti-Ly49C/I) donnent des résultats à peu près identiques. L'absence de réactivité avec

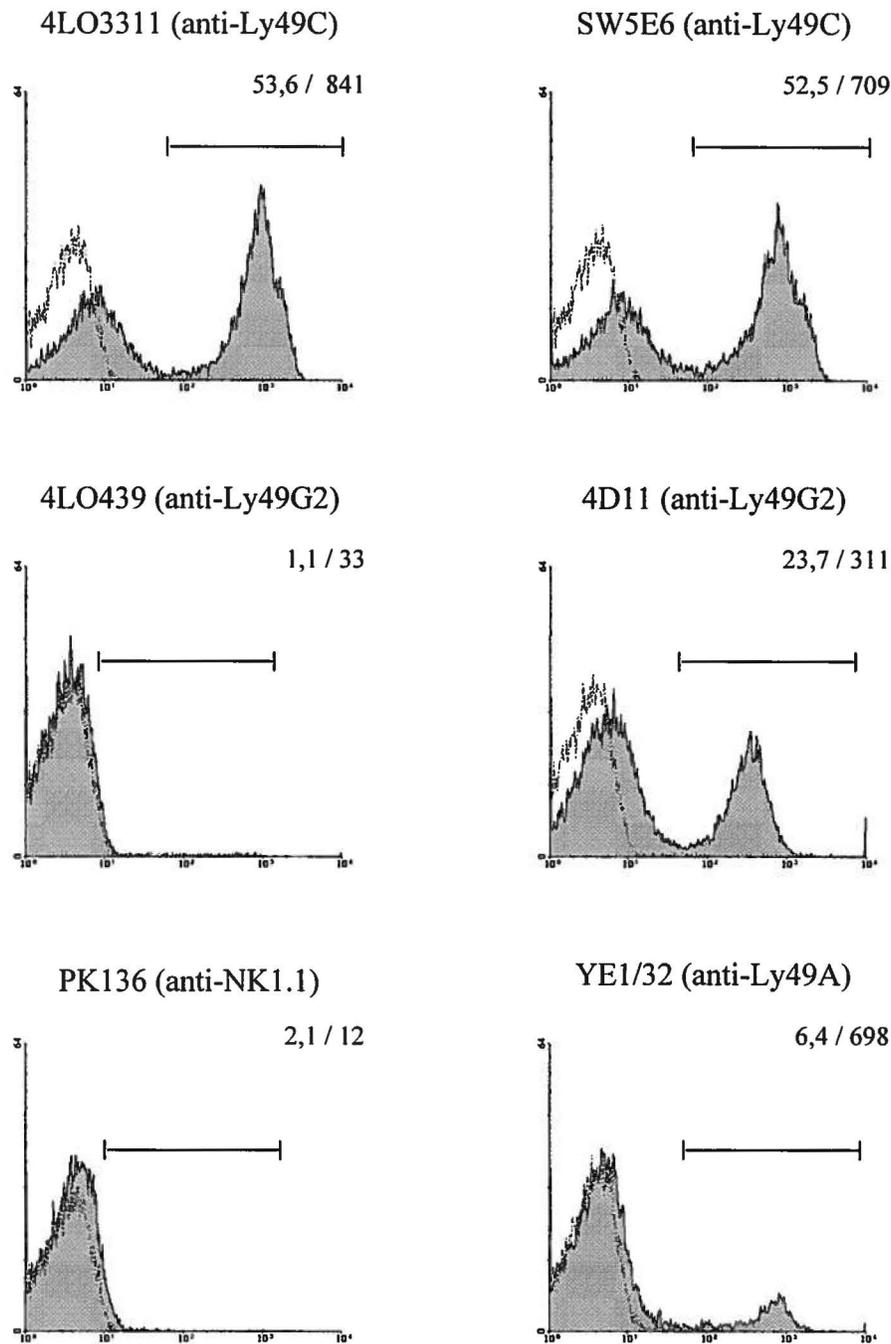


Figure 4. Phénotype des cellules NK de la souris BALB/c.

Les cellules NK spléniques ont été analysées par cytométrie en flux après incubation avec les AcM indiqués. Les valeurs en ordonnée correspondent au pourcentage de cellules positives pour le marquage avec chacun des AcM et celles en abscisse indiquent l'intensité moyenne de fluorescence sur une échelle logarithmique. Les chiffres dans le coin supérieur droit de chaque histogramme représentent ces deux données. Pour chaque échantillon, le niveau d'autofluorescence des cellules non marquées est indiqué par le trait pointillé. Ces résultats proviennent de trois expériences représentatives.

les anticorps 4LO439 (IgG3 de souris anti-Ly49G2) et PK136 (IgG2a anti-NK1.1) est conforme aux attentes puisque ces AcM sont l'un et l'autre spécifiques de molécules exprimées chez B6 mais non chez BALB/c (Koo et Peppard, 1984; Lemieux *et al.*, 1991; Depatie *et al.*, 1999). Dans ce contexte, ces deux réactifs deviennent d'excellents témoins isotypiques pour les deux anticorps anti-Ly49C et montrent clairement que dans les conditions de marquage utilisées, la fixation non spécifique de ces réactifs est négligeable. Détecté sur plus de 50% des cellules NK de la souris BALB/c, Ly49C est le plus commun des trois récepteurs qui ont pu être analysés. L'AcM 4D11 (IgG2a de rat anti-Ly49G2/A) ne colore que le quart des cellules de la suspension et l'AcM YE1/32 (IgG2a de rat anti-Ly49A) moins de 10%. Le nombre de cellules réagissant avec l'AcM 4LO3311 après culture de 6 à 8 jours en présence d'IL-2 augmente d'environ 10% et le niveau d'expression du récepteur Ly49C est également accru (résultats non illustrés).

Nous avons mentionné au chapitre 2 que notre laboratoire a observé une augmentation de l'exocytose granulaire lorsque des cellules LAK de souris BALB/c étaient incubées avec l'AcM 4LO3311 adsorbé dans les puits d'une plaque de culture (Morelli et Lemieux, 1993). Dans l'espoir de confirmer les propriétés activatrices du récepteur Ly49C, notre premier objectif était de mesurer l'effet de l'engagement du récepteur Ly49C sur la concentration cellulaire de l'ARNm de différentes cytokines. A première vue, les cellules LAK de BALB/c constituaient une bonne source cellulaire pour ces expériences considérant le pourcentage élevé de cellules qui réagissent avec l'AcM 4LO3311 et le haut niveau d'expression du récepteur sur les cellules positives. Les propriétés activatrices du récepteur NK1.1, en ce qui a trait à l'induction de la production de cytokines, ayant été rapportées (Arase, Arase et Saito, 1996; Kim et Yokoyama, 1998), l'activation via ce récepteur eut été un témoin positif de premier choix. Malheureusement, les souris de la souche BALB/c n'expriment pas le récepteur NK1.1 détecté par l'AcM PK136 (Figure 4). Même si elles expriment NK1.1, les souris B6 ne nous ont pas semblé très attrayantes étant donné que le pourcentage des cellules NK de cette souche qui expriment le récepteur Ly49C est seulement de 30% et que sa densité en surface cellulaire est réduite de 8 à 10 fois comparativement aux cellules NK de BALB/c (Figure 5 et Gosselin *et al.*, 1997). Nous avons estimé que les souris hybrides CB6

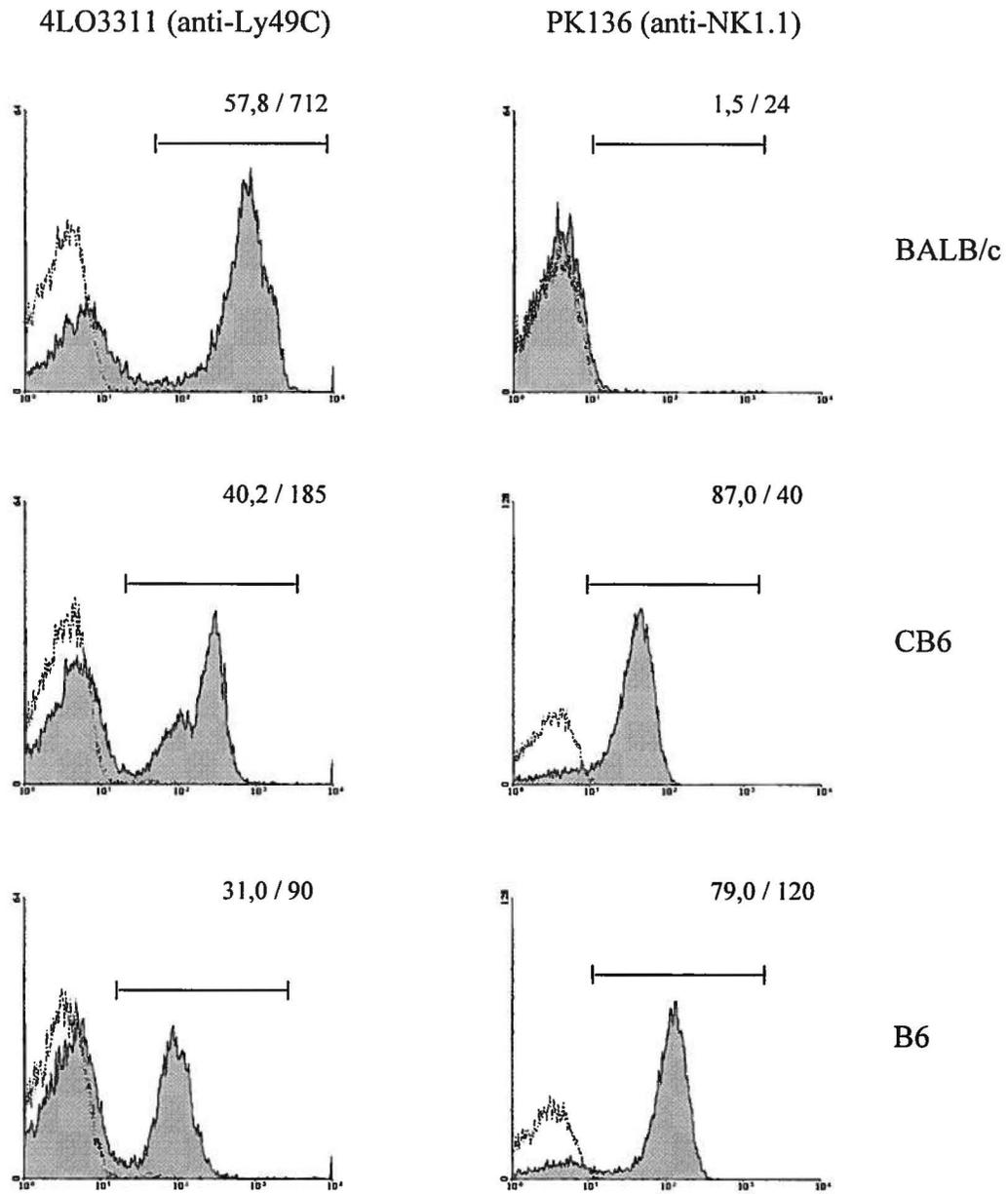


Figure 5. Expression des récepteurs NK1.1 et Ly49C sur les cellules NK de la souris hybride CB6 et des lignées parentales correspondantes.

Voir la légende de la figure 4. Ces résultats proviennent également de trois expériences représentatives, et bien que les échelles ne soient pas identiques sur l'axe des ordonnées de tous les histogrammes, le pourcentage de cellules positives ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence ne sont pas affectés.

constituaient un compromis que nous avons jugé acceptable. A l'instar de la souche parentale B6, les cellules NK de souris CB6 portent à leur surface le récepteur d'activation NK1.1. Quant au récepteur Ly49C, elles l'expriment à un niveau intermédiaire comparativement aux deux souches parentales chez qui le profil d'expression est également différent (Figure 5).

En choisissant d'utiliser des souris hybrides CB6 pour nos premières expérimentations, nous étions toutefois conscients que la présence, dans la suspension, de cellules exprimant les allèles Ly49C de B6 et de BALB/c pourrait éventuellement causer problème advenant que ceux-ci aient des propriétés différentes. Tel que rapporté antérieurement par notre équipe (Gosselin *et al.*, 1997), le profil de réactivité obtenu après coloration avec l'AcM 4LO3311 suggère que la majorité des cellules de souris CB6 expriment l'un ou l'autre des deux allèles (Figure 5). Cette observation a récemment été confirmée par une approche différente (Held et Kunz, 1998). Une alternative à l'utilisation de l'anticorps PK136 anti-NK1.1 comme témoin positif serait d'employer l'AcM 2.4G2 (IgG2b de rat anti-Fc γ RIIIA/CD16). L'augmentation de la transcription et de l'expression de gènes de cytokines après engagement du récepteur CD16 est bien documentée dans les cellules NK humaines (voir section 2.2.1) mais cette démonstration reste à faire dans le modèle murin. Par ailleurs, notre laboratoire a rapporté l'augmentation de l'exocytose granulaire à partir de cellules NK de BALB/c incubées dans des plaques de culture contenant l'AcM 2.4G2 adsorbé (Morelli et Lemieux, 1993).

4.3 Activation cellulaire via le récepteur Ly49C

Comme il n'existe pas de lignées de cellules NK chez la souris, la source de matériel biologique pour étudier l'activation pose problème. Étant donné que les expériences requièrent plusieurs témoins, elles peuvent difficilement être réalisées avec des cellules NK fraîches à cause de la faible taille de cette population lymphocytaire. C'est la raison pour laquelle nous avons opté pour l'utilisation de cellules LAK. Avec un facteur moyen de prolifération de 10X pour une culture de 6 à 8 jours en présence d'IL-2, on peut s'attendre à obtenir au moins 50 millions de cellules LAK à partir de trois souris,

ce qui permet d'inclure suffisamment d'échantillons dans une même expérience. Selon les différentes conditions expérimentales, chaque échantillon a nécessité de 2,4 à 4 x 10⁶ cellules. Cependant, des auteurs ayant rapporté que l'IL-2 peut induire la production d'IFN- γ par les cellules de la lignée humaine NK3.3 (Ye *et al.*, 1995), on pouvait s'attendre à ce qu'il y ait production constitutive de certaines cytokines par les cellules LAK qui ont été en présence d'IL-2 durant plusieurs jours. Pour éviter d'avoir des niveaux trop élevés dans les échantillons non-stimulés, nous avons donc pris soin de bien laver les cellules avant une stimulation avec les anticorps anti-Ly49C et nous les avons même incubées de façon routinière pendant une heure à 37°C dans un milieu contenant une quantité minimale d'IL-2 (20 à 50 U/ml selon les conditions de stimulation) après avoir constaté qu'il était ainsi possible de diminuer légèrement le niveau de base de leur métabolisme.

4.3.1 Stimulation avec des anticorps solubles

Notre laboratoire avait rapporté antérieurement l'augmentation de la lyse des cellules YAC-1 par des cellules NK de la souris BALB/c lorsque l'AcM 4LO3311 était ajouté au milieu de culture pour toute la période d'incubation des cellules effectrices avec les cellules cibles (Morelli et Lemieux, 1993). Nous avons donc tenté en premier lieu de stimuler des cellules LAK de souris CB6 en présence d'anticorps solubles. Pour cette première série d'expériences, nous avons dosé uniquement l'ARNm du TNF- α par RT-PCR quantitatif selon la méthode décrite à la section 3.6.3. Les cellules LAK ont été incubées pendant 4 h dans du milieu contenant 50 U/ml d'IL-2, additionné ou non de différentes quantités de l'AcM 4LO3311, d'un témoin isotypique IgG3, ou de l'AcM 2.4G2 (témoin positif d'activation). L'ARNm du TNF- α n'ayant été décelé dans aucun des échantillons, nous avons conclu que cette procédure de stimulation n'était pas adéquate et nous l'avons abandonnée.

4.3.2 Stimulation avec des anticorps adsorbés

L'absence d'activation dans les conditions exposées au paragraphe précédent n'était pas étonnante étant donné qu'il est reconnu que plusieurs récepteurs des cellules immunitaires nécessitent un pontage ou « cross-linking » pour pouvoir transmettre un signal à la cellule (Testi, Phillips et Lanier, 1989). Pour simuler de telles conditions, les anticorps ont donc été adsorbés dans les puits d'une plaque de culture selon la procédure décrite à la section 3.5.1. Dans les expériences préliminaires de mise au point méthodologique, des concentrations variables d'anticorps ont été testées avant d'opter pour la concentration de 2,5 µg/puits, ce qui est dans l'ordre de ce qui est utilisé par d'autres auteurs pour la stimulation d'autres types de cellules immunitaires via des récepteurs membranaires (Coligan *et al.*, 1991) et qui semble également être la quantité maximale d'AcM pouvant être adsorbée dans chacun des puits des plaques que nous avons utilisées. Nous avons également préparé des échantillons contenant différentes concentrations de PMA, un activateur de PKC afin d'avoir un témoin positif stable. Nous avons finalement réussi à définir des conditions satisfaisantes de stimulation. On peut voir dans la Figure 6 que la concentration d'ARNm du TNF- α mesurée par RT-PCR compétitif dans les échantillons incubés en présence de PMA est en corrélation avec la concentration de l'agent pharmacologique utilisée pour la stimulation. Ces résultats démontrent que la méthode choisie pour évaluer la stimulation cellulaire est adéquate. On détecte aussi de l'ARNm du TNF- α dans les échantillons stimulés avec les AcM 4LO3311 (anti-Ly49C) et 2.4G2 (anti-Fc γ RIIIA) mais pas dans ceux incubés avec le témoin isotypique IgG3 ou ne contenant aucun anticorps (Figure 6). Par contre, la stimulation via le récepteur NK1.1 avec l'AcM PK136 qui devait servir de témoin positif n'a pas donné les résultats attendus. Nous avons en effet décelé de l'ARNm du TNF- α dans les échantillons incubés avec l'AcM PK136 adsorbé mais il y en avait autant dans ceux incubés avec l'AcM 4-11G.6 qui servait de témoin isotypique (IgG2a de souris) (résultats non illustrés). Comme les cellules LAK expriment des récepteurs Fc γ RIIIA qui ont une certaine affinité pour les IgG2a murines (Ravetch et Kinet, 1991) et que nous avons observé une augmentation de la concentration d'ARNm du TNF- α dans les échantillons incubés avec des AcM anti-Fc γ RIIIA, on peut poser l'hypothèse que

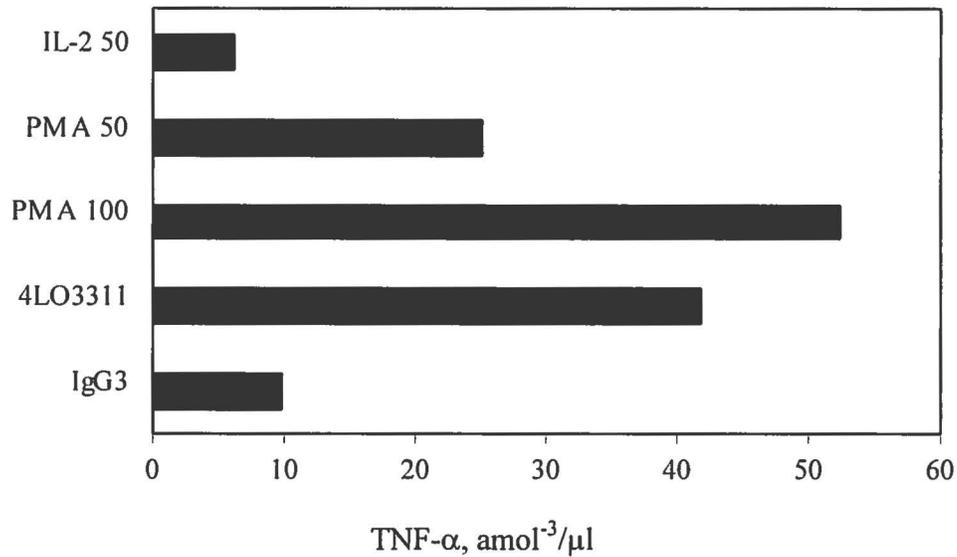


Figure 6. Concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α dans les cellules LAK de souris CB6 stimulées via le récepteur Ly49C.

Les cellules LAK ont été stimulées dans une concentration minimale d'IL-2 (50 U/ml) avec les AcM indiqués (méthode directe) ou avec le PMA (50 et 100 ng/ml). Les cellules en suspension ont été lysées avec le TRIzol[®] LS et analysées par RT-PCR quantitatif en utilisant des dilutions sériées (1:2) de la molécule standard. L'échantillon IL-2 50 est constitué de cellules non stimulées.

l'attachement de la portion Fc des IgG2a murines adsorbés aux récepteurs FcγRIIIA déclenche un signal d'activation. Quoiqu'il en soit, ayant obtenu avec l'AcM 2.4G2 le signal d'activation recherché, il n'y avait pas lieu de poursuivre la recherche d'un autre témoin positif surtout que l'activation obtenue avec l'AcM 2.4G2 allait nous permettre de reprendre nos analyses avec les cellules LAK dérivées de la souris BALB/c qui expriment des niveaux supérieurs du récepteur Ly49C.

Un des paramètres importants de la méthode que nous avons utilisée pour l'extraction de l'ARN total est la lyse des cellules avec le réactif TRIzol[®] LS. Nous avons noté que l'ajout du réactif aux cellules prélevées au terme de la période d'incubation avec l'AcM ne permettait pas une mesure exacte puisqu'une partie des cellules les plus activées restaient attachées au fond des puits. Pour corriger ce problème, nous avons pris l'habitude de prélever les cellules et de les concentrer par centrifugation, d'ajouter le TRIzol[®] LS dans les puits pour lyser celles qui sont restées attachées puis de le reprendre et de l'ajouter aux cellules concentrées. Cette procédure est très efficace et permet une récupération optimale des ARN totaux des cellules stimulées. Toutes les expériences subséquentes ont été réalisées dans ces conditions.

Bien que les résultats obtenus avec les cellules de souris CB6 aient été encourageants puisque les cellules semblaient répondre à la stimulation par un témoin positif (2.4G2), les différences observées entre les échantillons incubés avec le témoin isotypique IgG3 et l'AcM 4LO3311 adsorbés n'étaient pas très importantes, variaient sensiblement d'une expérience à l'autre, bref n'étaient pas toujours reproductibles. Nous espérons obtenir des résultats plus fiables avec les cellules de BALB/c puisque le nombre de cellules Ly49C⁺ dans la suspension est plus grand, le niveau d'expression est plus élevé et surtout la population est moins hétérogène que chez CB6 (Figure 5). Aussi avons-nous décidé de poursuivre l'étude avec les cellules LAK dérivées de la rate des souris BALB/c.

Dans une première expérience nous avons conservé les mêmes conditions que précédemment pour l'étape d'adsorption des anticorps mais nous avons fait varier la

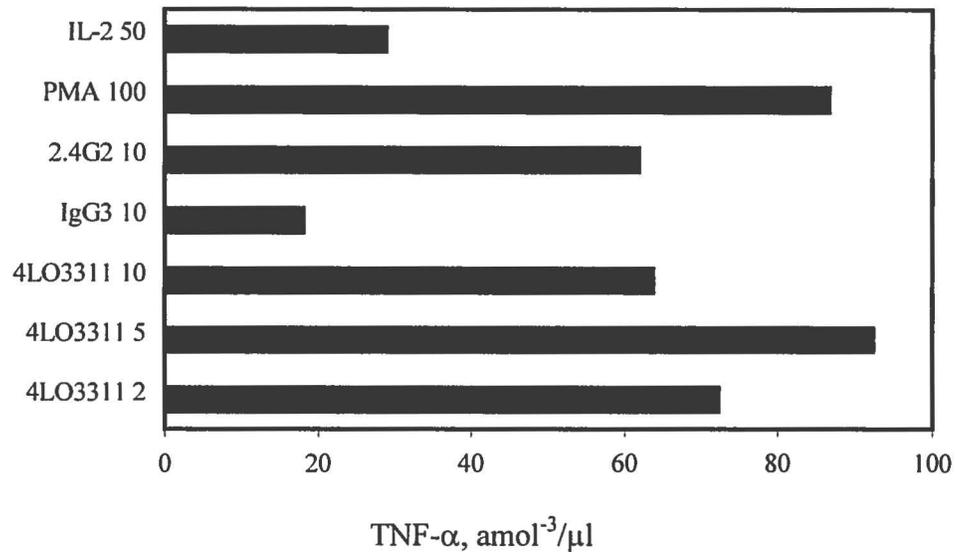


Figure 7. Concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α dans les cellules LAK de la souris BALB/c stimulées via les récepteurs Ly49C et Fc γ RIIIA.

Les cellules LAK ont été stimulées à raison de 2×10^5 (2), 5×10^5 (5) ou 1×10^6 (10) cellules par puits avec les AcM indiqués ou avec la PMA. Les cellules ont été lysées directement dans la plaque de stimulation et analysées par RT-PCR quantitatif. La concentration de 1×10^6 cellules par puit a été utilisée pour les échantillons ne contenant que l'IL-2 (IL-2 50) ou stimulés par le PMA (100ng/ml).

quantité de cellules incubées pour tenter d'optimiser la stimulation cellulaire avec l'AcM 4LO3311. Les résultats illustrés dans la Figure 7 montrent que les cellules LAK de BALB/c répondent bien à une stimulation par le PMA, le niveau d'ARNm du TNF- α étant 3 fois plus élevé dans cet échantillon que dans l'échantillon témoin ne contenant qu'une dose minimale d'IL-2. Dans les conditions identiques aux expériences précédentes, soit 1×10^6 cellules/puits, on note aussi un niveau d'ARNm du TNF- α 3 fois plus élevé dans les échantillons incubés avec les AcM 4LO3311 et 2.4G2 que dans ceux incubés avec le témoin isotypique IgG3. Bien que satisfaisantes, ces conditions n'étaient toutefois pas optimales puisque le niveau d'ARNm du TNF- α dans les échantillons contenant 5 fois moins de cellules est encore plus élevé et qu'il devient même équivalent à celui mesuré dans les échantillons stimulés avec le PMA dans les échantillons qui contiennent 5×10^5 cellules/puits. Puisqu'un signal d'activation était parfaitement perceptible à plus faible concentration cellulaire, les expériences subséquentes ont été exécutées en incubant les cellules à la concentration de 2×10^5 /puits. Pour avoir suffisamment d'ARN total, chaque échantillon était constitué de 12 puits pour un total de $2,4 \times 10^6$ cellules.

Pour réduire encore le niveau de base dans les échantillons témoins, les cellules ont été privées totalement d'IL-2 pendant une heure juste avant de procéder à la stimulation par les anticorps. De plus, la concentration d'IL-2 de maintien pendant la stimulation a été réduite de 2,5 fois, soit à 20 U/ml. Nous avons également décidé d'ajouter 1,0 μ g/ml de l'ionophore calcique A23187 aux échantillons stimulés par le PMA afin de permettre une meilleure mobilisation du calcium et ainsi constituer un meilleur témoin positif d'activation. Les conséquences de l'application de telles conditions sont illustrées dans la Figure 8. Le niveau basal d'activation est effectivement réduit sensiblement avec un taux inférieur à $10 \text{ amol}^{-3}/\mu\text{l}$ d'ARNm de TNF- α dans les échantillons témoins négatifs (IL-2 20 U/ml et IgG3). Le facteur de stimulation du témoin positif (PMA + ionophore calcique) est alors d'environ 4. Il est même un peu plus élevé dans l'échantillon incubé dans les puits contenant l'AcM anti-Ly49C adsorbé et plus encore lorsque les cellules sont stimulées via le récepteur Fc γ RIIIA.

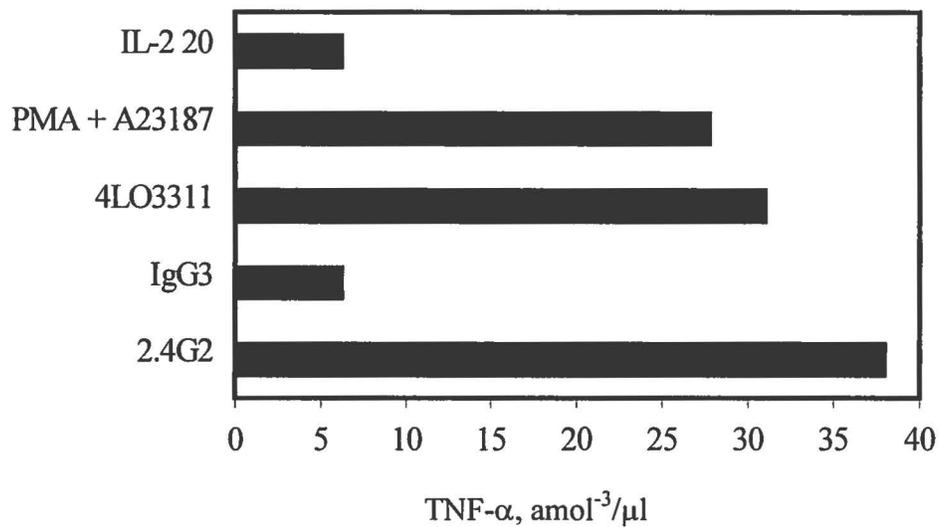


Figure 8. Concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α dans les cellules LAK de souris BALB/c stimulées via le récepteur Ly49C en conditions optimisées.

Les cellules LAK ont été privées totalement d'IL-2 avant d'être stimulées à raison de 2×10^5 cellules par puits dans du milieu contenant 20 U/ml d'IL-2. L'échantillon PMA + A23187 a été stimulé avec 100 ng/ml de PMA et 1 μ g/ml de l'ionophore calcique A23187.

Ces expériences ont été reprises plusieurs fois dans des conditions identiques. Le niveau de base s'étant avéré assez variable d'une expérience à l'autre, nous pouvons difficilement présenter les données sous forme de moyennes. De toute façon, c'est davantage l'évidence d'un signal d'activation suite à l'engagement du récepteur Ly49C qui nous intéressait que le niveau absolu d'ARNm du TNF- α mesuré dans les extraits d'ARN total. Sauf pour une expérience qui a donné des résultats discordants, les observations allaient toujours dans le même sens soit, une activation perceptible dans les échantillons stimulés avec le PMA et l'inophore calcique ou incubés avec les AcM 4LO3311 ou 2.4G2 et le maintien du niveau de base dans les échantillons incubés avec le témoin isotypique IgG3. Nous n'avons pas noté de différences selon que les cellules LAK étaient prélevées après 6, 7 ou 8 jours de culture en présence d'IL-2. Il est toutefois possible que le niveau d'expression des récepteurs Ly49C et Fc γ RIIIA ait pu varier en fonction du temps de culture ce qui expliquerait les variations du facteur d'activation via ces récepteurs dans les différentes expériences. Pour des raisons de logistique, nous n'avons malheureusement pas pu effectuer de façon systématique la mesure du taux de cellules positives et de l'intensité moyenne de fluorescence après marquage avec les AcM 4LO3311 et 2.4G2 pour chaque échantillon de cellules LAK utilisées dans des expériences d'activation. Ces deux paramètres peuvent être déterminants dans l'intensité du signal généré lors de l'engagement des récepteurs.

Ayant pu vérifier que la stimulation des cellules LAK via le récepteur Ly49C avec l'AcM 4LO3311 induisait une augmentation de la concentration des ARNm spécifiques au TNF- α , nous avons voulu vérifier si l'activation via le récepteur Ly49C s'appliquait à la régulation de la transcription d'autres gènes de cytokines dont la production par les cellules NK a été rapportée. Comme il était possible qu'après activation, la transcription en ARNm de chacun et leur dégradation se fassent selon une cinétique différente, nous avons mesuré par RT-PCR quantitatif l'ARNm du TNF- α , de l'IFN- γ et du GM-CSF après incubation des cellules avec les anticorps adsorbés pour une période de 2 à 8 h. Les témoins habituels ont été ajoutés pour tous les temps d'incubation. Dans les conditions utilisées, les résultats ont révélé que le niveau optimal d'ARNm du TNF- α est atteint après 2 h d'incubation avec l'AcM 4LO3311 alors que celui de l'IFN- γ requiert 6 h

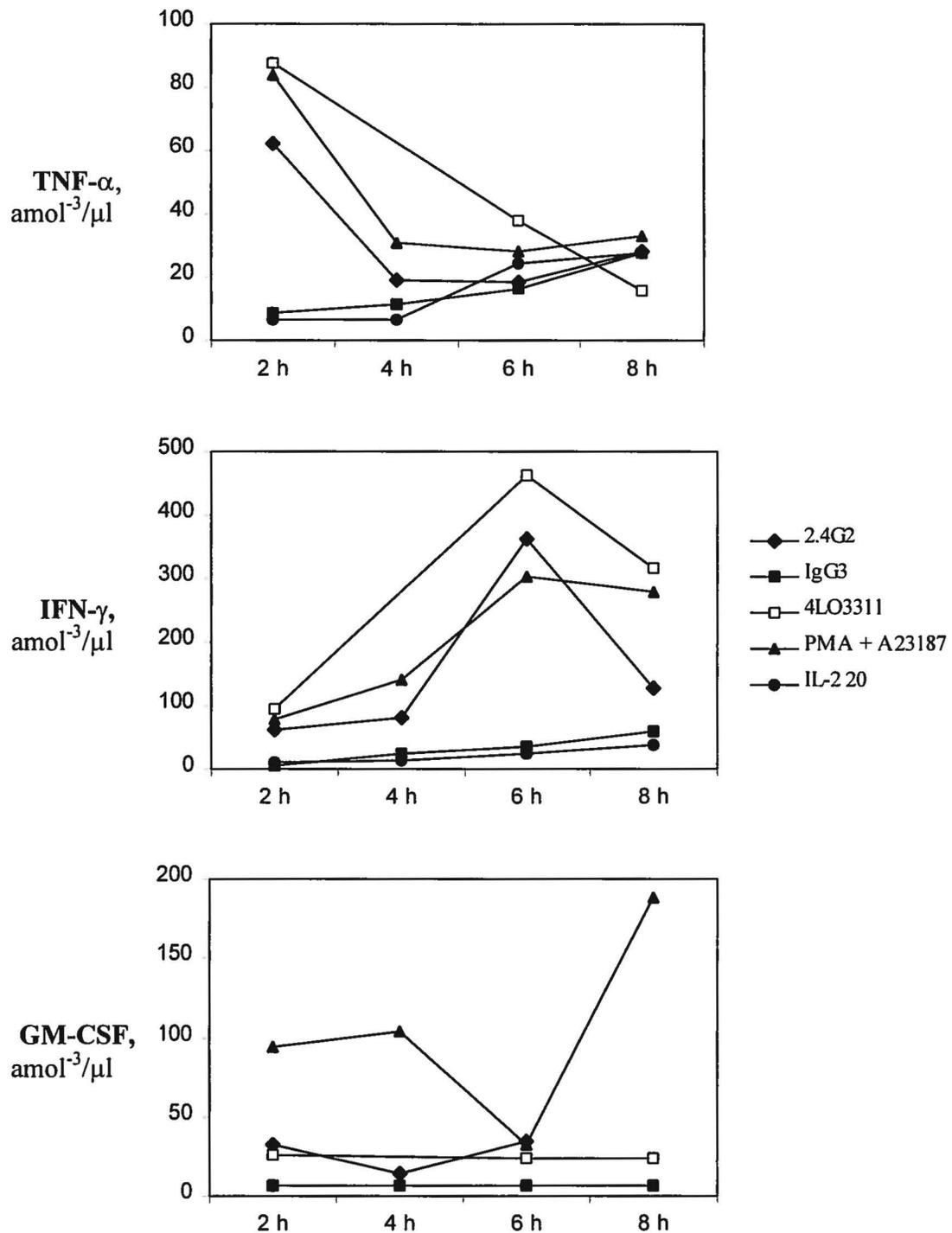


Figure 9. Analyse cinétique de la concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α , à l'IFN- γ et au GM-CSF dans les cellules LAK de souris BALB/c.

Les cellules LAK privées d'IL-2 ont été stimulées par la méthode directe et lysées directement dans la plaque de stimulation après 2, 4, 6 ou 8 h de stimulation. La concentration des ARNm spécifiques a été mesurée par RT-PCR quantitatif.

d'incubation et que l'ARNm du GM-CSF n'est pas affecté suite à l'engagement du récepteur Ly49C du moins pour la période testée (Figure 9). Bien que l'échantillon cellulaire stimulé avec l'AcM 4LO3311 pendant 4 h soit absent dans les trois graphiques de la Figure 9, il semble que, selon les résultats déjà obtenus, la concentration des ARNm spécifiques au TNF- α ne varie pas suffisamment entre 2 et 4 h de stimulation pour justifier de reprendre les expériences antérieures, d'autant plus que nous avons déjà mis en évidence l'augmentation de la concentration des ARNm de cette cytokine après 4 h de stimulation avec l'AcM 4LO3311. Comme nous l'avons déjà souligné, c'est la détection d'un signal d'activation davantage que son intensité qui importe dans le présent contexte. Il faut toutefois souligner que le niveau d'ARNm de l'IFN- γ diffère sensiblement de celui du TNF- α . En fait, après 6 h de stimulation, la concentration des ARNm de l'IFN- γ dépasse 300 amol⁻³/μl dans l'échantillon stimulé via le récepteur Fc γ R11A et dépasse 400 amol⁻³/μl dans celui stimulé via le récepteur Ly49C. En refaisant un RT-PCR avec les amorces spécifiques de l'IFN- γ pour des échantillons dans lesquels peu d'ARNm du TNF- α avait été détecté, nous avons noté que même si ces échantillons ne correspondent pas au temps optimal d'incubation, les niveaux d'ARNm de l'IFN- γ sont encore une fois plus élevés que ceux de l'ARNm du TNF- α dans les échantillons incubés avec les anticorps (Figure 10). Étant donné que la concentration des ARNm spécifiques à l'IFN- γ semblait être la plus influencée par une stimulation via Ly49C, nous avons dosé, pour les expériences suivantes, l'ARNm de cette cytokine dans les extraits cellulaires préparés après incubation des cellules pendant 6 h dans les puits contenant les AcM adsorbés.

4.4 Comparaison de l'effet de l'engagement du récepteur Ly49C avec différents AcM

Les résultats exposés jusqu'à présent supportent l'hypothèse de la transmission d'un signal d'activation via le récepteur Ly49C à tout le moins après engagement avec l'AcM 4LO3311 adsorbé. Nous avons déjà mentionné que cet AcM reconnaît un déterminant situé dans la tige de la portion extracellulaire du récepteur qui relie le CRD à la membrane cellulaire. Il existe un autre AcM connu qui réagit avec le récepteur Ly49C, soit SW5E6. Cet AcM reconnaît un épitopes situé dans le CRD mais celui-ci est aussi

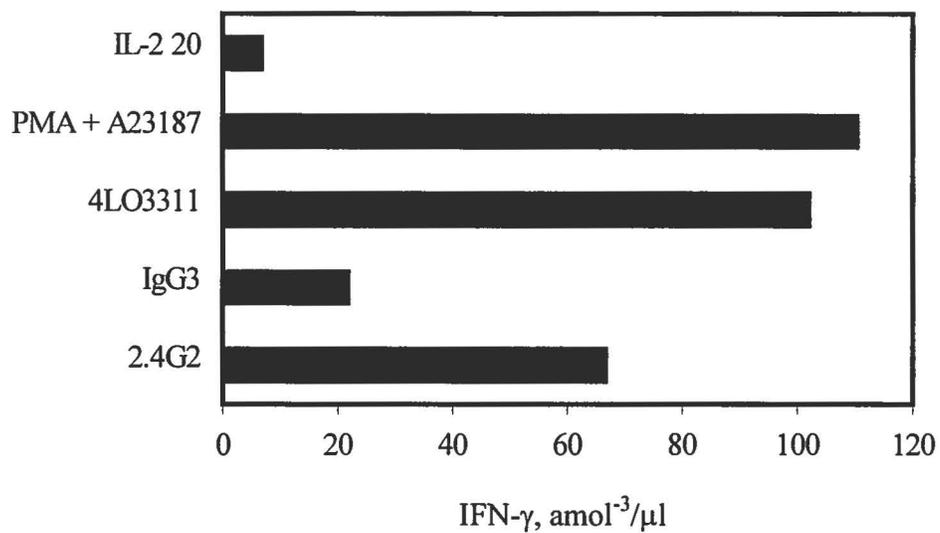


Figure 10. Concentration intracellulaire des ARNm spécifiques à l'IFN- γ dans les cellules LAK de la souris BALB/c stimulées via le récepteur Ly49C.

La mesure de la concentration des ARNm spécifiques à l'IFN- γ a été effectuée à partir de lysats cellulaires ayant déjà servis au dosage des ARNm spécifiques au TNF- α . Les cellules ont été stimulées pendant 4 h avant d'être lysées et analysées par RT-PCR quantitatif.

présent dans le récepteur Ly49I. Comme le récepteur Ly49I n'est pas exprimé chez BALB/c, nous avons la possibilité d'utiliser l'AcM SW5E6 pour évaluer les conséquences de l'engagement du récepteur Ly49C via une autre partie de la portion extracellulaire de la molécule. L'AcM SW5E6 étant une IgG2a de souris, nous ne pouvions toutefois l'utiliser directement puisque nous avons observé que les immunoglobulines de cet isotype se fixaient aux cellules LAK et produisaient une activation indépendante de la spécificité de l'anticorps (voir le premier paragraphe de la section 4.3.2). Nous avons donc transformé le protocole de stimulation. Les cellules LAK de BALB/c ont été incubées d'abord avec les AcM anti-récepteurs solubles, lavées puis distribuées dans les puits d'une plaque de culture contenant des fragments $F(ab')_2$ d'IgG de chèvre dirigés contre les IgG de souris (GAM) ou de rat (GAR). La méthode indirecte de stimulation est décrite en détails à la section 3.5.2. Seul l'ARNm de l'IFN- γ a été dosé dans les premières expériences de stimulation indirecte. La Figure 11 montre que dans ces conditions il n'y a pas d'activation significative dans les échantillons qui ont été incubés qu'avec les anticorps GAM et GAR ou préincubés avec les témoins isotypiques IgG2a et IgG3. La préincubation en phase soluble avec les AcM 2.4G2 et 4LO3311 donnent des résultats identiques à ceux obtenus après incubation avec les anticorps complets (voir Figure 8, 9 et 10). Par contre, l'ARNm de l'IFN- γ est resté au niveau de base dans les échantillons préincubés avec l'AcM SW5E6 qui détecte pourtant le récepteur Ly49C aussi efficacement que l'AcM 4LO3311 (voir Figure 4).

Ces résultats suggéraient que la nature du signal généré via le récepteur Ly49C pouvait dépendre de la partie de la molécule engagée dans la liaison. Nous avons bien sûr repris ces expériences à plusieurs reprises mais les résultats n'étaient pas toujours reproductibles. Des stimulations subséquentes avec la méthode indirecte n'ont montré aucune augmentation dans la concentration des ARNm de l'IFN- γ aussi bien dans l'échantillon stimulé avec l'AcM 4LO3311 que dans l'échantillon stimulé avec l'AcM SW5E6. Considérant l'importance de nos observations, nous avons décidé d'utiliser une autre méthode pour détecter l'ARN spécifique soit le buvardage de type Northern décrit à la section 3.6.4. Nous avons d'abord repris l'analyse d'échantillons préalablement dosés par la méthode du RT-PCR compétitif. Deux exemples sont illustrés dans la Figure 12. Ils

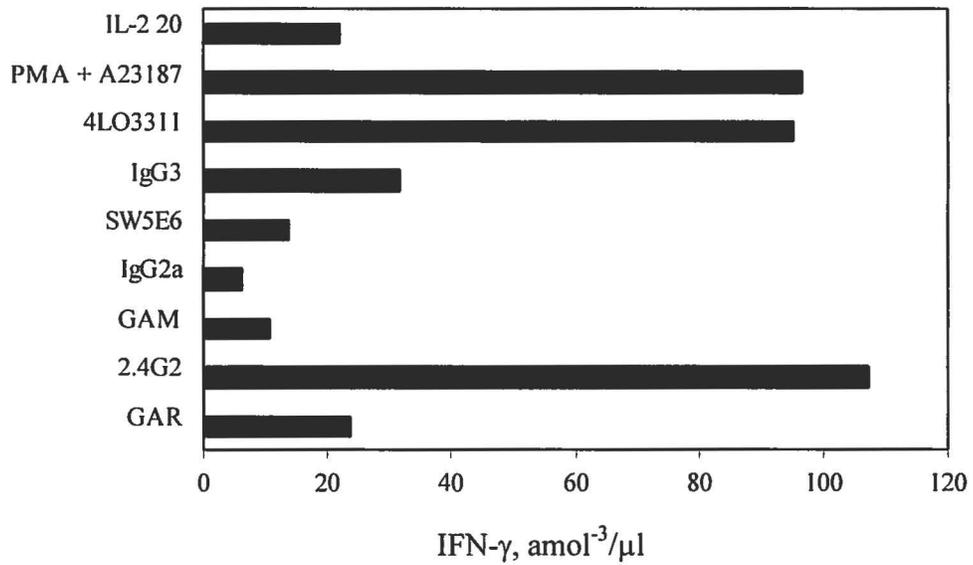


Figure 11. Comparaison de l'effet de deux AcM anti-Ly49C sur la concentration intracellulaire des ARNm spécifiques à l'IFN- γ dans les cellules LAK de la souris BALB/c stimulées par la méthode indirecte.

Les cellules ont été stimulées par la méthode indirecte décrite à la section 3 et analysées par RT-PCR quantitatif. Les échantillons GAM et GAR ont été stimulés avec l'AcM secondaire uniquement.

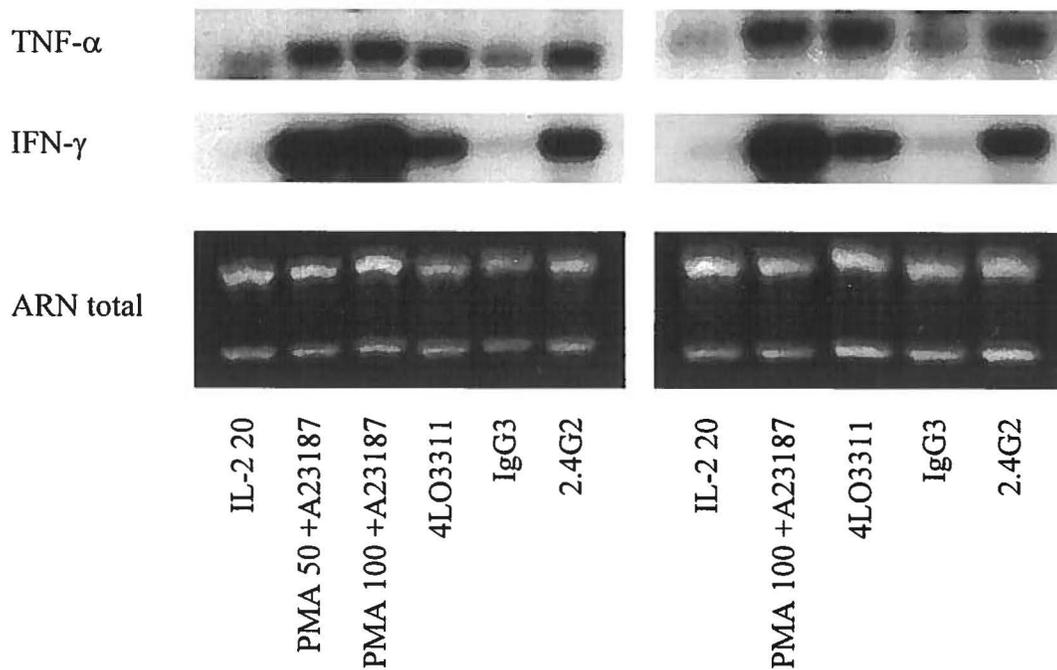


Figure 12. Analyse par buvardage de type Northern de la concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF- α et à l'IFN- γ dans les cellules LAK de souris BALB/c stimulées via le récepteur Ly49C.

L'ARN total cellulaire obtenu à partir de lysats de cellules LAK stimulées par la méthode directe a été soumis à un buvardage de type Northern et hybridé avec des sondes spécifiques au TNF- α et à l'IFN- γ . L'image du gel d'ARN (ARN total) montre l'intégrité de l'ARN extrait et permet de vérifier que des quantités similaires d'ARN ont été hybridés pour chacun des échantillons.

correspondent à des stimulations par des anticorps complets adsorbés au fond des puits. Les panneaux du bas confirment l'intégrité de l'ARN des extraits et permettent de vérifier que des quantités similaires d'ARN ont été hybridés pour chacun des échantillons. L'hybridation avec la sonde spécifique de l'ARN de l'IFN- γ donne les résultats les plus clairs. On note dans les deux autoradiogrammes la présence d'une forte bande dans les échantillons stimulés par le PMA et l'ionophore calcique ou incubés avec les anticorps anti-Ly49C et anti-Fc γ RIIIA alors que les incubations sans anticorps ou en présence du témoin isotypique IgG3 ne donnent que de très faibles signaux. Ces résultats confirment donc ceux obtenus avec la méthode du RT-PCR compétitif mais par leur caractère plus visuel, ils illustrent mieux le pouvoir activateur du récepteur Ly49C suite à son engagement par l'AcM 4LO3311. Les résultats étaient moins clairs lorsque les membranes ont été hybridées avec la sonde spécifique du TNF- α . Les différences d'intensité entre les bandes vont dans le même sens mais le bruit de fond est nettement plus élevé.

Ces expériences ont été reprises soit par le protocole de stimulation avec les AcM complets adsorbés soit selon la méthode en deux étapes tel qu'utilisée pour l'expérience présentée dans la Figure 11. En révélant l'ARNm spécifique de l'IFN- γ par buvardage de type Northern, nous avons ainsi confirmé plusieurs fois l'activation via le récepteur Ly49C dans les échantillons incubés avec les anticorps complets adsorbés. Par contre, nous n'avons pu, par cette méthode d'analyse détecter l'ARNm recherché dans les expériences de stimulation indirecte. En effet, bien que le buvardage de type Northern ait révélé une concentration d'ARNm spécifique augmentée dans l'échantillon stimulé avec l'AcM 2.4G2, aucun effet semblable n'a été décelé dans les autres échantillons et ce, tant dans les nouvelles expériences de stimulation indirecte que dans les expériences antérieures réanalysées par buvardage de type Northern. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'AcM SW5E6 ne peut être utilisé dans la méthode d'activation par les anticorps adsorbés parce que les anticorps de cet isotype (IgG2a de souris) se fixent sur les récepteurs Fc γ RIIIA et activent la cellule via un récepteur autre que Ly49C. A cette étape du projet, le doute subsistait donc à savoir si le signal d'activation via le récepteur Ly49C ne pouvait être induit par un anticorps spécifique du CRD.

Suite à une fusion entre les cellules spléniques d'un hamster arménien, immunisé avec des cellules LAK de souris BALB/c, et les cellules du myelome P3X63Ag8.653, notre laboratoire a récemment sélectionné un hybridome appelé 5GA5 qui, comme SW5E6, sécrète un AcM spécifique du CRD des récepteurs Ly49C et Ly49I (Paré, 1995; Depatie *et al.*, 1999). La disponibilité de ce réactif nous a permis d'envisager un autre protocole de stimulation utilisant cette fois des fragments F(ab')₂ adsorbés. Puisque nous disposions également d'un AcM appelé 4LO439 du même isotype que 4LO3311 mais ne réagissant pas avec les cellules de la souris BALB/c, nous l'avons utilisé pour préparer des fragments F(ab')₂ témoins pour cette expérience. Les fragments F(ab')₂ des AcM 4LO3311, 5GA5 et 2.4G2 ont aussi été préparés dans les mêmes conditions. Ne disposant pas de l'hybridome produisant l'AcM SW5E6 nous n'avons cependant pas pu préparer de fragments F(ab')₂ de cet AcM. Les fragments F(ab')₂ des IgG de hamster utilisés comme témoin étaient de provenance commerciale (voir section 3.1). L'expérience illustrée dans la Figure 13 fait le parallèle entre la stimulation par les anticorps complets et les fragments F(ab')₂. Dans la partie gauche, on peut voir des résultats identiques à ceux que nous avons présentés dans les figures précédentes soit une bande aussi intense que celle du témoin d'activation (PMA + ionophore calcique) pour l'hybridation des extraits provenant des échantillons incubés avec les AcM 4LO3311 et 2.4G2 et absence de signal pour les extraits provenant des échantillons incubés sans anticorps ou avec les IgG3 témoin de source commerciale. Fait inattendu, nous avons observé un signal avec l'AcM 4LO439. L'AcM 5GA5 complet n'a pas été inclus dans cette expérience parce qu'à l'instar des IgG2a de souris, les IgG de hamster induisent une activation non spécifique. La partie droite de la Figure 13 montre les résultats de stimulation par les fragments F(ab')₂. Le seul extrait qui fixe la sonde spécifique de l'ARNm de l'IFN- γ est celui de l'échantillon incubé avec les fragments F(ab')₂ de l'acM 2.4G2. Ce type de stimulation a été repris 3 fois et l'image de la figure 13 montre le plus haut taux d'ARNm spécifiques détecté dans l'échantillon stimulé avec les fragments F(ab')₂ de l'AcM 2.4G2.

Ces résultats nous ont fait suspecter que la procédure que nous utilisons pour purifier les anticorps pouvait générer un contaminant activateur pour les cellules LAK. Pour nous en assurer, nous avons obtenu du Dr P. Talbot un hybridome appelé A.1.9

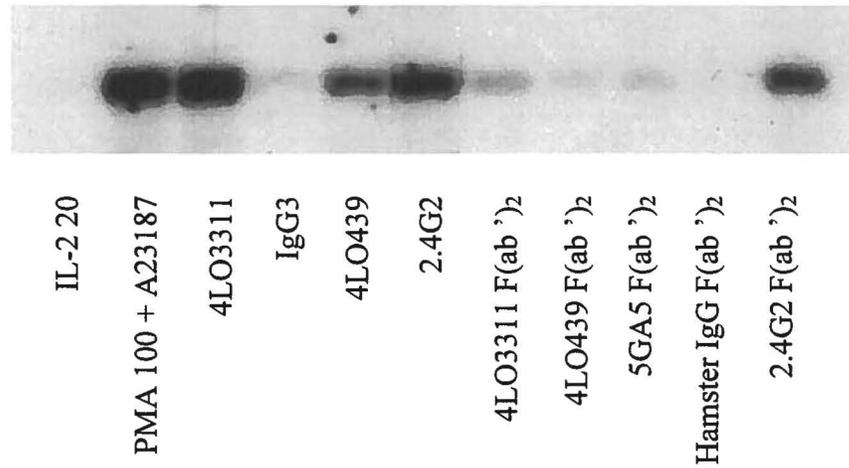


Figure 13. Comparaison de l'effet des témoins isotypiques IgG3 et 4LO439 et des fragments F(ab')₂ des AcM anti-Ly49C 4LO3311 et 5GA5.

L'ARN total cellulaire obtenu à partir de lysats de cellules LAK stimulées avec des AcM complets ou avec des fragments F(ab')₂ par la méthode directe a été soumis à un buvardage de type Northern et hybridé avec une sonde spécifique à l'ARNm de l'IFN- γ . Une quantité similaire d'ARN a été utilisée pour chacun des échantillons.

sécrétant un AcM d'isotype IgG3 qui réagit spécifiquement avec la glycoprotéine S1 de la souche A59 du coronavirus murin (Fleming *et al.*, 1983) et nous l'avons purifié dans les conditions habituelles. Après avoir vérifié l'absence de réactivité de cet AcM avec les cellules NK par cytométrie en flux, nous l'avons inclus comme témoin isotypique dans une expérience plus sophistiquée impliquant des cellules LAK de BALB/c triées avec des billes magnétiques sur la base de leur réactivité avec l'AcM 4LO3311 à la fin de la procédure d'enrichissement. L'expression du récepteur Ly49C sur les deux populations sélectionnées a été vérifiée la veille de leur utilisation pour une expérience de stimulation avec des anticorps complets adsorbés. Les histogrammes de la Figure 14 montrent l'efficacité de la sélection puisque 97% des cellules de la population positive expriment le récepteur Ly49C. La déplétion n'est toutefois pas totale dans l'autre population qui contient toujours un peu plus de 10% de cellules qui réagissent avec l'acM 4LO3311. La différence entre les deux populations devrait tout de même être manifeste si la stimulation par l'AcM 4LO3311 se fait réellement via le récepteur Ly49C. Or selon les résultats illustrés dans la Figure 15, il est clair que ce n'est pas le cas. L'AcM 4LO3311 et son contrôle isotypique l'AcM A.1.9 mais non les IgG3 de provenance commerciale stimulent de manière équivalente les cellules positives et négatives. Il nous faut donc convenir que les conditions de purification de nos anticorps ne nous permettent pas de trancher quant à la capacité d'induire un signal d'activation via le récepteur Ly49C.

4.5 Phosphorylation sur tyrosine des protéines cellulaires

Les expériences exposées dans cette section ont été réalisées en parallèle avec celles qui portaient sur la mesure des ARNm de différentes cytokines suite à l'engagement du récepteur Ly49C par l'AcM 4LO3311. Nous espérons détecter une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines cytoplasmiques, ce qui est un phénomène précoce relié à l'activation d'autres types de cellules immunitaires (Gold, Law et DeFranco, 1990; Klausner et Samelson, 1991). Les cellules LAK de BALB/c ont donc été stimulées avec des AcM solubles et le pontage des récepteurs ainsi liés a d'abord été effectué par l'ajout, en phase soluble, de fragments F(ab')₂ d'IgG de chèvre dirigées contre les chaînes lourdes et légères des IgG de souris ou de rat dans les conditions

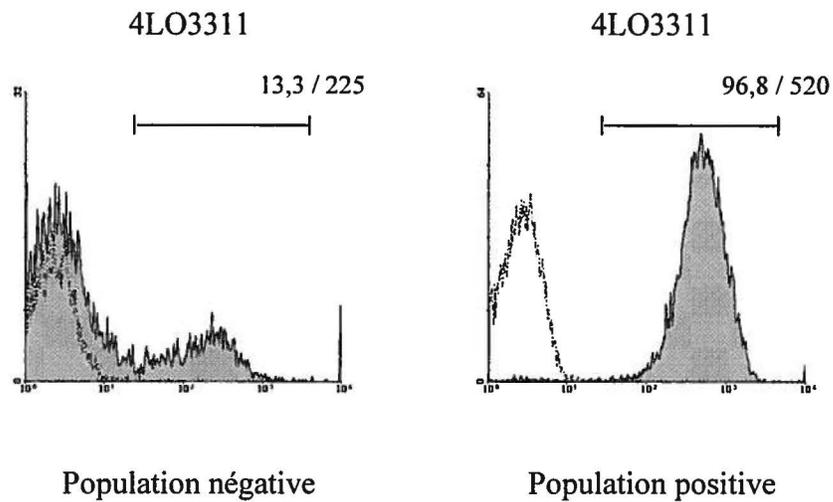


Figure 14. Expression du récepteur Ly49C sur les cellules LAK de la souris BALB/c triées sur la base de leur réactivité avec l'AcM 4LO3311.

Les cellules ont été triées avec l'AcM 4LO3311 et des billes magnétiques à la fin de la procédure d'enrichissement. La veille de la stimulation, les cellules ont été marquées avec l'AcM 4LO3311 couplé à la biotine et avec un conjugué SA-RED 670TM, puis analysées par cytométrie en flux.

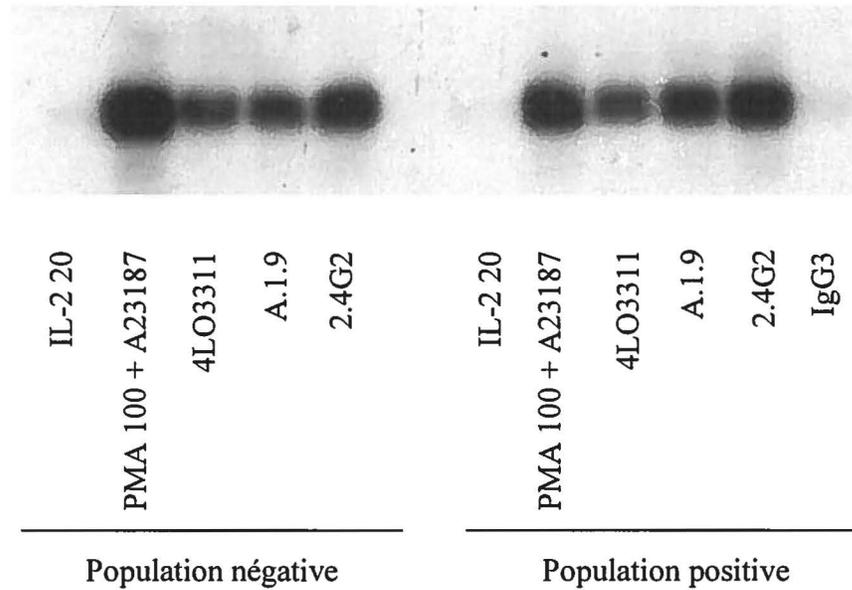


Figure 15. Comparaison de l'effet de l'AcM 4LO3311 et du témoin isotypique A.1.9 sur la concentration des ARNm de l'IFN- γ dans les cellules LAK de la souris BALB/c triées sur la base de leur expression du récepteur Ly49C.

Les cellules ont été stimulées par la méthode directe, lysées et soumises à une analyse par buvardage de type Northern en utilisant une sonde spécifique pour l'IFN- γ . Une quantité similaire d'ARN a été utilisée pour chacun des échantillons.

décrites à la section 3.7.1. Les cellules ont été lysées et les extraits soumis à une électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices puis analysés par immunobuvardage avec l'AcM anti-phosphotyrosine 4G10. La méthode est décrite en détails à la section 3.7.2.

Utilisant l'AcM 2.4G2, la stimulation via le récepteur FcγRIIIA nous a servi de modèle pour définir les conditions optimales d'activation. La phosphorylation sur tyrosine étant un événement transitoire, nous avons d'abord déterminé la durée optimale de stimulation dans ce modèle. Nous avons observé que 2 min de contact avec les fragments F(ab')₂ de l'anticorps secondaire permettait d'observer la phosphorylation de nombreux substrats. La quantité de protéines phosphorylées retrouvées dans l'échantillon stimulé via le récepteur FcγRIIIA était comparable à celle observée dans l'échantillon témoin positif stimulé avec le pervanadate de sodium (résultats non illustrés). Dans les expériences ultérieures, la stimulation par les AcM 4LO3311 et 2.4G2 a été comparée tout en incluant des témoins négatifs stimulés uniquement avec les fragments F(ab')₂ des anticorps secondaires GAM et GAR. Nous avons de nouveau obtenu une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines de l'échantillon stimulé avec l'AcM 2.4G2 mais également dans l'échantillon témoin incubé uniquement avec les fragments F(ab')₂ de GAR (résultats non illustrés), ce qui met en doute la spécificité de la stimulation. Par ailleurs, aucune augmentation de phosphorylation n'était observable dans les échantillons stimulés avec l'AcM 4LO3311 ou avec les fragments F(ab')₂ de GAM. Comme les deux anticorps secondaires n'ont pas la même spécificité, nous n'avons pas de preuve que les fragments F(ab')₂ d'IgG de chèvre anti-IgG de souris que nous avons utilisés reconnaissent efficacement les IgG3.

La stimulation non-spécifique obtenue avec un des deux anticorps secondaires et le doute que nous avons quant à l'efficacité de l'autre nous a obligés à modifier encore une fois le protocole de stimulation. Afin d'avoir un seul réactif secondaire pour les échantillons expérimentaux et les témoins, nous avons décidé d'incuber les cellules avec les AcM anti-récepteurs biotinylés et d'utiliser l'avidine pour réaliser le pontage. La Figure 16 illustre l'effet des variations du temps de contact de l'AcM 2.4G2 avec les

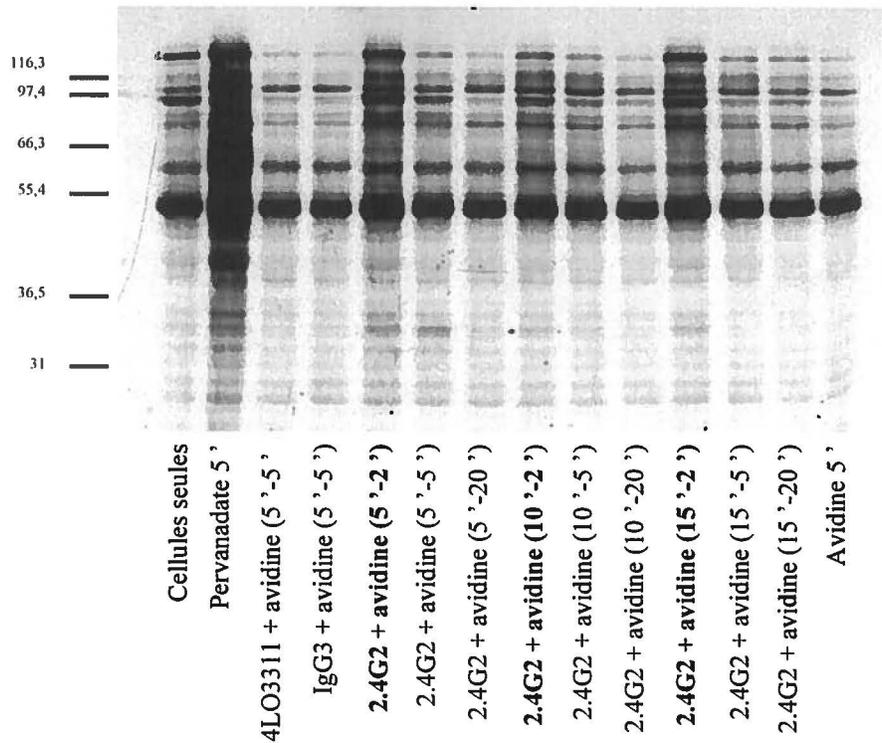


Figure 16. Phosphorylation sur tyrosine des protéines cytoplasmiques dans les cellules LAK de souris BALB/c stimulées avec des AcM biotinylés et de l'avidine.

Les protéines des lysats de cellules LAK stimulées dans les conditions indiquées ont été séparées par SDS-PAGE puis soumises à un immunobuvardage en utilisant l'AcM anti-phosphotyrosine 4G10 pour l'hybridation. Des quantités similaires de protéines ont été utilisées pour chacun des échantillons. Pour la stimulation, la durée de contact entre les cellules et les AcM variait de 5 à 15 min alors que la durée du pontage variait entre 2 et 20 min.

cellules et de la durée de l'incubation en présence de l'avidine. Les résultats montrent que, dans les conditions testées, l'activation de la phosphorylation suite à l'engagement du récepteur FcγRIIIA par l'AcM 2.4G2 est indépendante du temps de contact de l'anticorps avec les cellules, du moins pour la période testée. Par contre, la durée de contact avec le réactif secondaire est déterminante et ne doit pas dépasser 2 min. Il n'y a pas d'augmentation de la phosphorylation des protéines dans l'échantillon incubé 5 min uniquement avec le réactif secondaire pas plus que dans les échantillons incubés préalablement avec l'AcM anti-Ly49C ou son témoin isotypique. Nous avons bien sûr repris les expériences avec l'AcM 4LO3311 dans les conditions ayant donné de bons résultats pour l'AcM 2.4G2 mais nous n'avons jamais observé d'augmentation de phosphorylation sur tyrosine dans ces échantillons. Il importe de mentionner que la réponse dans l'échantillon témoin stimulé via le récepteur FcγRIIIA n'était pas constante non plus. Peu satisfaits de cette approche, nous l'avons abandonnée pour nous concentrer sur les expériences d'immunoprécipitation présentées à la section 4.7.

4.6 Protéines associées aux récepteurs Ly49

A cette étape de notre expérimentation, nous étions toujours perplexes concernant les propriétés fonctionnelles du récepteur Ly49C suite à son engagement par l'AcM 4LO3311. Or les interactions protéiques impliquées dans la transmission du signal engendré lors de l'engagement d'un récepteur membranaire peuvent nous éclairer sur ses fonctions. Nous avons donc voulu identifier les protéines cytoplasmiques capables d'interagir avec le récepteur Ly49C et les comparer à celles capables d'interagir avec deux autres récepteurs Ly49 dont les propriétés inhibitrices ont été établies et avec un récepteur Ly49 dont les propriétés activatrices étaient suspectées d'après sa structure. Pour arriver à cette fin, nous avons utilisé la technique du Far Western décrite à la section 3.8.2. En utilisant une protéine de fusion contenant le domaine intracellulaire du récepteur Ly49 à l'étude, nous avons procédé à la purification des protéines cellulaires capables de s'y associer. Comme ces expériences nécessitaient un grand nombre de cellules, les lysats cellulaires ont été préparés à partir des cellules RNK-16, une lignée de cellules NK de rat (Reynolds *et al.*, 1984).

Dans un premier temps, les protéines de fusion nécessaires au criblage des lysats cellulaires ont été purifiées sur billes de Sépharose[®]-glutathion à partir de deux souches de bactéries différentes soit DH5 α (pour GST, GST-Ly49A, GST-Ly49C, GST-Ly49G2 et GST-Ly49H) et TKX1 (pour GST-Ly49A p-tyr, GST-Ly49C p-tyr et GST-Ly49G2 p-tyr), les protéines de fusion avec la mention p-tyr étant obtenues sous forme phosphorylée sur tyrosine après induction de la phosphorylation dans la souche TKX1. La protéine de fusion GST-Ly49H n'a pu être produite sous forme phosphorylée puisque la portion cytoplasmique du récepteur Ly49H ne contient aucune tyrosine (Brennan *et al.*, 1994). Nous avons confirmé la pureté des protéines obtenues par l'analyse des éluats en SDS-PAGE en conditions réductrices, suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (résultats non illustrés). Cette étape nous a également permis d'évaluer visuellement la concentration relative des différentes protéines de fusion et ainsi d'en normaliser la quantité pour le reste des manipulations. Toutes les protéines de fusion ont aussi été analysées par immunobuvardage avec l'AcM 4G10 qui reconnaît spécifiquement les phosphoprotéines. Tel qu'attendu, seules les protéines de fusion purifiées à partir de la souche TKX1 ont été révélées par l'AcM 4G10, ce qui confirme la capacité de phosphorylation des trois transfectants TKX1.

Les protéines de fusion, phosphorylées ou non et associées aux billes de Sépharose[®]-glutathion ont été utilisées pour purifier les protéines contenues dans le lysat de cellules RNK-16. Les protéines capables de s'associer à la portion cytoplasmique des récepteurs Ly49 peuvent ainsi être purifiées. Elles sont ensuite éluées, séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose puis révélées avec les formes phosphorylée et non phosphorylée de la protéine de fusion GST-Ly49C marquées au ³²P. Les résultats d'une expérience-type sont présentés à la Figure 17. La partie droite de la figure montre que la sonde GST-Ly49C phosphorylée révèle deux protéines d'environ 68 à 70 kD dans les éluats obtenus après la purification du lysat cellulaire sur les protéines de fusion GST-Ly49A, GST-Ly49C et GST-Ly49G2 phosphorylées. Ces protéines ne s'associent vraisemblablement qu'aux phosphoprotéines puisque la même sonde ne révèle aucune bande dans l'éluat obtenu après purification du lysat cellulaire sur la protéine de fusion GST-Ly49C non phosphorylée. L'absence de bandes dans l'extrait purifié sur la

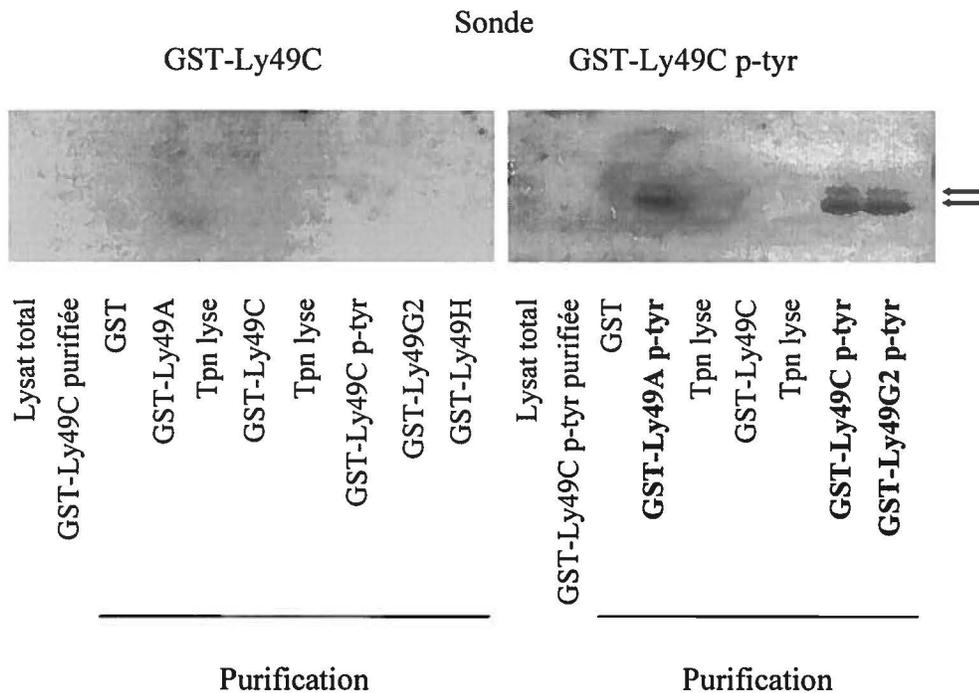


Figure 17 : Hybridation avec les protéines de fusion GST-Ly49C et GST-Ly49C p-tyr radiomarquées au ^{32}P des éluats obtenus après purification par affinité des protéines contenues dans un lysat de cellules RNK-16. (Far Western Blotting).

Les protéines éluées après la purification par affinité des lysats de cellules RNK-16 sur les protéines de fusion indiquées ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane et hybridées avec les protéines GST-Ly49C et GST-Ly49C p-tyr radiomarquées au ^{32}P . À titre de témoin négatif un lysat cellulaire a été purifié sur la protéine GST (produit du plasmide sans insertion). Des échantillons constitués de tampon de lyse (tpn lyse) passé sur la protéine de fusion GST-Ly49C phosphorylée ou non sur tyrosine ont aussi été hybridés. Également, un lysat non purifié de cellules RNK-16 ainsi que les protéines de fusion servant de sonde ont été hybridés.

protéine GST (produit du plasmide sans insertion) témoigne que c'est bien à la portion cytoplasmique des récepteurs Ly49 que se sont associées les deux protéines décelées dans les extraits purifiés sur les protéines de fusion phosphorylées. En outre, celles-ci sont bien d'origine cellulaire puisqu'aucune bande n'est décelée dans l'éluat obtenu après passage du tampon de lyse sur la protéine de fusion GST-Ly49C phosphorylée ou non phosphorylée. La sonde ne se lie pas non plus avec la protéine GST-Ly49C phosphorylée que nous avons fait migrer comme témoin. Enfin, l'absence de réactivité de la sonde GST-Ly49C phosphorylée avec le lysat total nous assure que les protéines révélées ont été concentrées par la purification d'affinité du lysat cellulaire. Tel qu'illustré dans la partie gauche de la Figure 17, quelle qu'ait été la protéine de fusion utilisée pour la purification des protéines du lysat cellulaire, aucune bande n'a été détectée avec la sonde GST-Ly49C non phosphorylée.

Puisque la purification d'affinité des lysats cellulaires sur trois protéines de fusion différentes a révélé des bandes de même poids moléculaire et que d'autre part, l'association des PTP SHP-1 et SHP-2 aux récepteurs Ly49A et/ou Ly49G2 a déjà été rapportée (Nakamura *et al.*, 1997; Mason *et al.*, 1997), nous avons pensé que ces deux PTP devaient être les protéines révélées par la sonde GST-Ly49C phosphorylée. Nous avons donc fait migrer les mêmes éluats dans de nouveaux gels SDS-PAGE, transféré les protéines sur membrane de nitrocellulose et les avons hybridées avec des anticorps polyclonaux anti-SHP-1 et anti-SHP-2. Les résultats illustrés dans la Figure 18 nous permettent d'affirmer qu'à l'instar des récepteurs Ly49A et Ly49G2, la portion cytoplasmique phosphorylée du récepteur Ly49C est capable de lier les PTP SHP-1 et SHP-2. En effet, des protéines de même poids moléculaire que celles révélées dans les buvardages de type Far Western sont détectées par les anticorps anti-SHP-1 et anti-SHP-2 dans les éluats obtenus après purification des protéines des lysats cellulaires sur les protéines de fusion GST-Ly49A, GST-Ly49C et GST-Ly49G2 phosphorylées. Les éluats obtenus après purification des protéines du lysat des cellules RNK-16 sur la protéine GST-Ly49H servent de témoin négatif puisque celle-ci ne peut lier les PTP SHP-1 et SHP-2 à cause de l'absence de tyrosine dans la partie cytoplasmique du récepteur Ly49H.

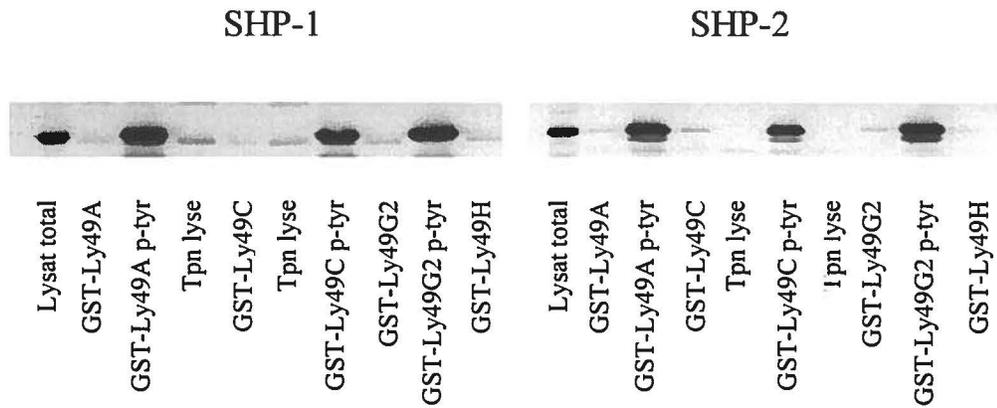


Figure 18 : Immunobuvardage avec les anticorps polyclonaux anti-SHP-1 et anti-SHP-2 des protéines de cellules RNK-16 éluées après purification par affinité sur les différentes protéines de fusion.

Les protéines éluées après le purification par affinité des protéines contenues dans le lysat de cellules RNK-16 sur les protéines de fusion indiquées ont été hybridées avec les anticorps anti-SHP-1 et anti-SHP-2 après séparation en SDS-PAGE et transfert sur membrane. Des échantillons constitués de tampon de lyse ont été passés sur la protéine de fusion GST-Ly49C phosphorylée ou non sur tyrosine et ont été utilisés comme témoins négatifs.

4.7 Phosphorylation sur tyrosine des récepteurs Ly49

Les résultats de la section précédente ont établi la capacité de la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C d'être phosphorylé au niveau de l'ITIM et de s'associer, sous cette forme seulement, aux PTP SHP-1 et SHP-2. Toutefois, le système utilisé pour cette démonstration était assez artificiel puisqu'il s'agissait de protéines de fusion et non du récepteur natif. Nous avons donc voulu savoir ce qu'il en était des propriétés du récepteur natif après stimulation globale de cellules LAK avec le pervanadate de sodium ou mieux encore après engagement du récepteur Ly49C par l'AcM 4LO3311.

Nous avons, en un premier temps, immunoprécipité le récepteur Ly49C après stimulation des cellules LAK de BALB/c avec du pervanadate de sodium puis nous avons vérifié sa phosphorylation, par immunobuvardage avec l'AcM 4G10 des protéines préalablement séparées par SDS-PAGE en conditions réductrices et transférées sur membrane de nitrocellulose. Des auteurs avaient rapporté la phosphorylation du récepteur Ly49C dans de telles conditions (Mason *et al.*, 1997). Par contre, comme les cellules LAK qu'ils avaient utilisé provenaient de la souris B6 et que l'immunoprécipitation avait été effectuée avec l'AcM SW5E6 qui détecte les récepteurs Ly49C et Ly49I, ces expériences ne permettent pas de conclure hors de tout doute que le récepteur Ly49C est effectivement phosphorylé dans ces conditions. Dans l'expérience illustrée dans la Figure 19, nous avons utilisé comme témoin positif l'immunoprécipitation avec l'AcM 4D11 qui détecte le récepteur Ly49G2 (Mason *et al.*, 1988 et 1995) mais qui réagit également de façon croisée avec le récepteur Ly49A (Takei, Brennan et Mager, 1997; Salcedo *et al.*, 1997). Rappelons que la phosphorylation de ces deux récepteurs après stimulation au pervanadate a déjà été établie (Mason *et al.*, 1997). Alors qu'une protéine de 65 kD correspondant à la forme réduite du récepteur Ly49C est révélée par l'anticorps anti-phosphotyrosine dans l'échantillon stimulé au pervanadate et immunoprécipité avec l'AcM 4LO3311, aucune bande n'est détectée après immunoprécipitation avec l'AcM 4D11. Si ces résultats démontrent que le récepteur Ly49C est effectivement phosphorylé dans ces conditions de stimulation, nous avons tout de même été surpris de ne pas

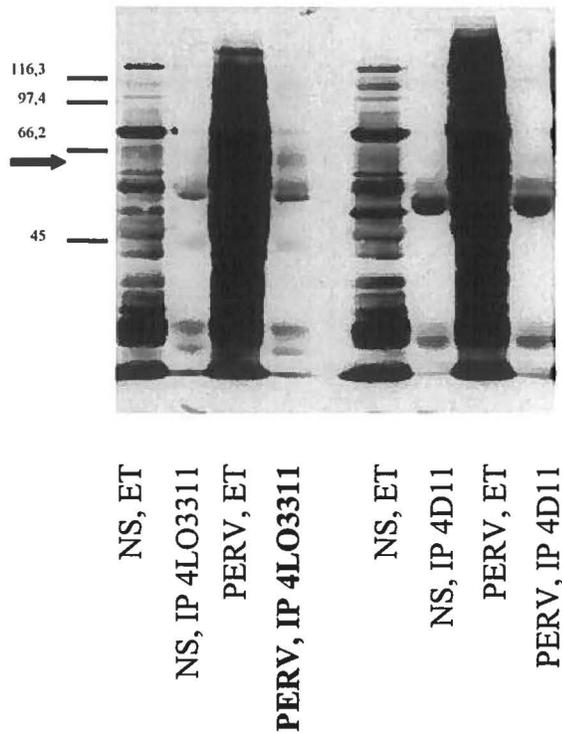


Figure 19. Immunobuvardage avec l'AcM anti-phosphotyrosine 4G10 des protéines Ly49C et Ly49G2 immunoprécipitées à partir de cellules LAK de souris BALB/c.

Les récepteurs Ly49C et Ly49G2 ont été immunoprécipités respectivement avec les AcM 4LO3311 et 4D11 à partir de cellules stimulées au pervanadate de sodium (PERV) ou non stimulées (NS). Les protéines précipitées ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur membrane et hybridées avec l'AcM 4G10. L'extrait total (ET) à partir duquel chaque précipitation a été faite a également été hybridé pour chaque échantillon.

détecter de réactivité après immunoprécipitation des récepteurs Ly49G2/Ly49A. Il faut toutefois noter que la proportion de cellules exprimant ces récepteurs chez BALB/c est assez faible (voir section 4.1) et nous avons conclu qu'il s'agissait vraisemblablement d'une insuffisance de matériel dans les immunoprécipités.

Pour les expériences suivantes, nous avons doublé le nombre de cellules utilisées pour chaque immunoprécipitation afin de pouvoir mieux visualiser les récepteurs précipités. En outre, dans le cas du récepteur Ly49G2, l'utilisation des cellules LAK de B6 dont 40% expriment ce récepteur nous a permis de faire les immunoprécipitations avec l'AcM 4LO439 qui est spécifique de l'allèle de B6 du récepteur Ly49G2. Ces conditions nous ont effectivement permis de détecter une bande à 40 kD après hybridation avec l'AcM 4G10 dans les échantillons stimulés avec le pervanadate et immunoprécipités avec l'AcM 4LO439 (Figure 20). Pour évaluer l'effet d'une stimulation via les récepteurs Ly49C et Ly49G2, nous avons aussi tenté de reproduire à partir de ces mêmes cellules les résultats publiés par Mason *et al.* (1997) selon lesquels une simple stimulation avec un AcM anti-Ly49G2 sans pontage par un anticorps secondaire pouvait entraîner la phosphorylation sur tyrosine du récepteur. Parallèlement, nous avons tenté de stimuler les cellules LAK de BALB/c via le récepteur Ly49C avec l'AcM 4LO3311. Cette approche n'a pas fonctionné, aucune protéine de la taille appropriée n'étant décelée après activation via Ly49C ou Ly49G2. Comme dans les expériences précédentes, une phosphoprotéine de 65 kD est décelée dans les échantillons stimulés au pervanadate de sodium et soumis à une immunoprécipitation avec l'AcM 4LO3311. Nous présentons aussi dans la Figure 20, la détection par l'AcM 4G10 du récepteur Ly49C phosphorylé à partir d'un échantillon stimulé au pervanadate et immunoprécipité avec l'AcM SW5E6. La comparaison des protéines des extraits totaux (ET) des échantillons non stimulés, stimulés par les AcM ou par le pervanadate illustre éloquemment la puissance de cet agent pharmacologique dans l'induction de la phosphorylation sur tyrosine d'une grande quantité de substrats.

Dans une dernière tentative de stimulation via les récepteurs Ly49, nous avons ajouté une étape de pontage avec des anticorps de chèvre dirigés contre la portion Fc des

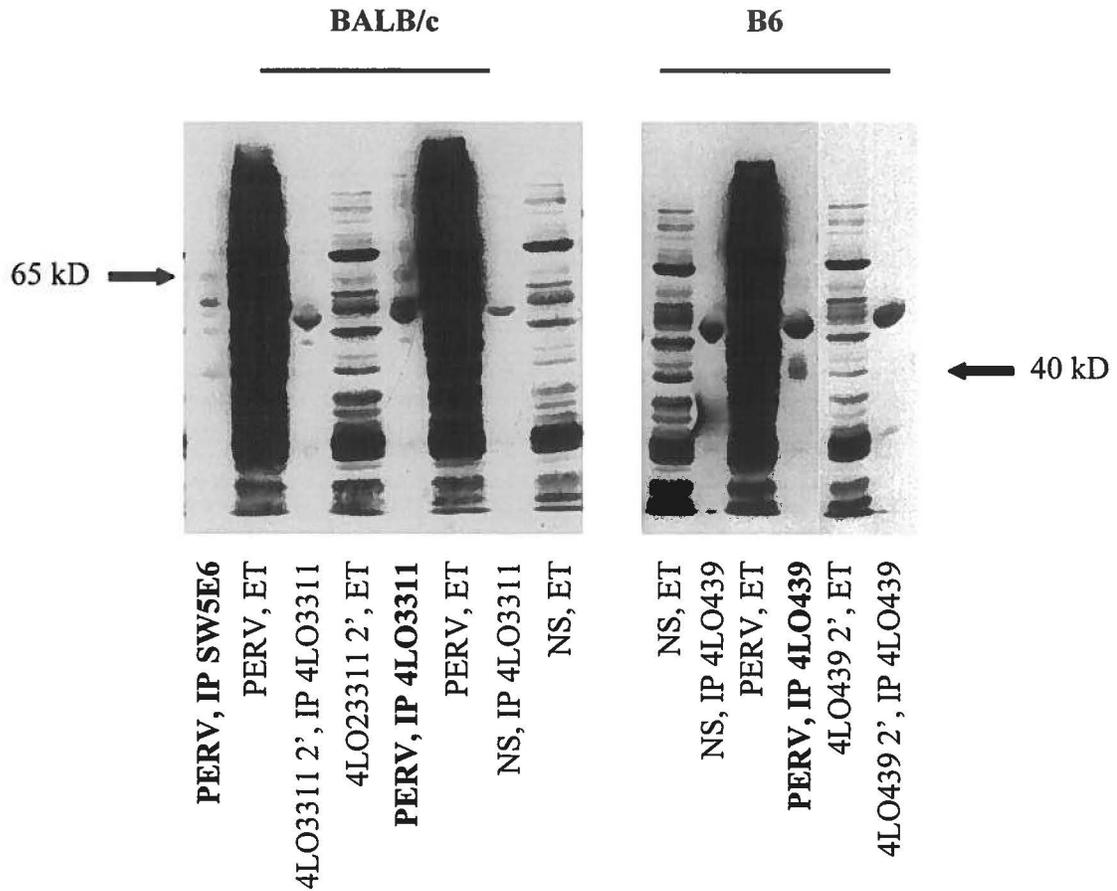


Figure 20. Immunobuvardage avec l'AcM 4G10 des protéines Ly49C et Ly49G2 immunoprécipitées avec différents AcM à partir de cellules LAK de souris BALB/c et B6

Le récepteur Ly49C a été immunoprécipité avec les AcM 4LO3311 et SW5E6 à partir de cellules LAK de souris BALB/c stimulées au pervanadate de sodium, non stimulées ou stimulées pendant 2 min avec l'AcM 4LO3311. Le récepteur Ly49G2 a été précipité avec l'AcM 4LO439 à partir de cellules LAK de souris B6 stimulées ou non au pervanadate ou stimulées pendant 2 min avec l'AcM 4LO439.

IgG de souris (GAM) dans les conditions décrites à la section 3.7.1. Immunoprécipitation, électrophorèse et transfert sur membrane de nitrocellulose ont été exécutés dans les conditions habituelles. Les protéines transférées ont été hybridées d'abord avec l'AcM 4G10 pour contrôler la phosphorylation des récepteurs ciblés puis réhybridées avec l'AcM anti-SHP-1 dans l'espoir de confirmer dans un contexte *in situ* l'association des récepteur Ly49C et Ly49G2 avec cette PTP. Nous avons pu observer l'association de l'enzyme SHP-1 autant dans les échantillons stimulés au pervanadate que dans les échantillons stimulés avec les anticorps 4LO3311 et 4LO439 (Figure 21, au-dessus de la bande d'Ig). L'absence de l'enzyme SHP-1 dans les échantillons non stimulés nous a assuré de la spécificité de la révélation. Bien que les résultats ne soient pas illustrés, les extraits totaux ont aussi été hybridés avec l'AcM anti-SHP-1 et la protéine recherchée y a été décelée. Une expérience identique a été reprise mais, contrairement à nos attentes, seuls les récepteurs immunoprécipités à partir des échantillons stimulés au pervanadate étaient phosphorylés sur tyrosine. Nous avons cherché comme précédemment à détecter la présence de SHP-1 mais cette fois-ci c'est la révélation avec le deuxième anticorps qui n'a pas fonctionné.

Bien que très près du but, j'ai malheureusement dû abandonner mes recherches à cette étape, ayant alors largement dépassé le temps alloué à la phase expérimentale d'un projet de maîtrise. Même s'il semble que la PTP SHP-1 co-immunoprécipite avec les récepteurs Ly49C et Ly49G2 (Figure 21), ces expériences devront être répétées étant donné que nous n'avons pas pu vérifier la phosphorylation sur tyrosine des deux récepteurs dans cette même expérience.

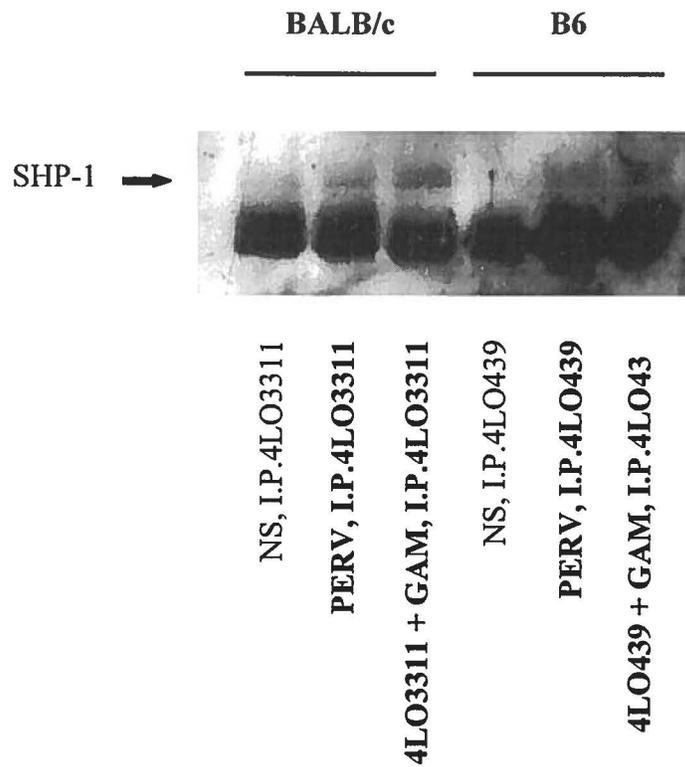


Figure 21. Immunobuvardage avec l'anticorps polyclonal anti-SHP-1 des protéines Ly49C et Ly49G2 immunoprécipitées à partir de cellules LAK de souris BALB/c et B6.

Les récepteurs Ly49C et Ly49G2 ont été immunoprécipités respectivement à partir des cellules LAK de souris BALB/c et B6 non stimulées, stimulées au pervanadate, stimulées avec les anticorps 4LO3311 et GAM dans le cas des cellules de BALB/c et avec les anticorps 4LO439 et GAM dans le cas des cellules de B6.

5. DISCUSSION

5.1 Analyse phénotypique

Comme il a déjà été mentionné, les résultats obtenus en cytométrie en flux suite aux marquages de surface des cellules NK ont guidé notre choix de souche de souris pour les expérimentations. Chez la souris BALB/c, les cellules qui expriment le récepteur Ly49C sont reconnues aussi bien par l'AcM 4LO3311 que par l'AcM SW5E6 qui détectent des populations de même taille (Figure 4). Bien que l'AcM SW5E6 reconnaisse un épitope commun aux récepteurs Ly49C et Ly49I chez la souris B6, il semble que l'allèle du récepteur Ly49I reconnu par cet AcM ne soit pas exprimé chez la souris BALB/c (Brennan *et al.*, 1996a), ce qui explique que les deux AcM anti-Ly49C reconnaissent des populations aussi semblables. Ceci nous a donc assurés que nous pouvions utiliser l'AcM SW5E6 dans les expériences de stimulation des cellules de la souris BALB/c via le récepteur Ly49C et ainsi comparer son effet à celui de l'AcM 4LO3311 sans que l'analyse des résultats ne soient compliquée par la réactivité croisée de l'AcM SW5E6. Par ailleurs, nous avons entrepris les premières expériences de stimulation en utilisant la souche de souris CB6 étant donné que les cellules NK de cette souche de souris, mais non celles de BALB/c, expriment le récepteur d'activation NK1.1, que nous aurions voulu utiliser comme témoin positif. Toutefois, l'hétérogénéité de la population détectée par l'AcM 4LO3311 chez cette souche de souris aurait pu compliquer l'analyse des résultats puisque la souris CB6 exprime les deux allèles parentaux du récepteur Ly49C (Figure 5). C'est pourquoi, dès que nous avons pu obtenir un témoin positif d'activation avec les cellules de la souris BALB/c, en l'occurrence la stimulation via FcγRIIIA avec l'AcM 2.4G2, nous avons choisi d'utiliser cette souche de souris.

5.2 Activation cellulaire via le récepteur Ly49C

L'étude du récepteur Ly49C a généré par le passé des résultats contradictoires quant à ses propriétés fonctionnelles. Plusieurs éléments nous ont poussés à formuler

l'hypothèse que le récepteur Ly49C pourrait transmettre des signaux d'inhibition ou d'activation.

Notre laboratoire a déjà rapporté une augmentation de la lyse de cellules YAC-1 par des cellules LAK de souris BALB/c en présence de l'AcM 4LO3311 (Morelli et Lemieux 1993). Cependant, la lignée cellulaire YAC-1 exprime les molécules de classe I du CMH H-2K^k et H-2D^d qui servent toutes deux de ligands au récepteur Ly49C^{B6} (Lian *et al.*, 1999) et apparemment au récepteur Ly49C^{BALB/c} (Hanke *et al.*, 1999). Il est donc possible que l'ajout de l'AcM ait plutôt empêché l'interaction entre le récepteur Ly49C et un de ses ligands, ce qui se traduirait par une levée de l'inhibition de lyse si le récepteur Ly49C possède une fonction inhibitrice comme l'ont suggéré d'autres auteurs. Cette interprétation était toutefois difficilement envisageable au moment où les résultats de Morelli et Lemieux (1993) ont été publiés étant donné que l'identité de la molécule NK2.1 reconnue par l'AcM 4LO3311 avec le récepteur Ly49C n'a été établie qu'en 1997 (Gosselin *et al.*, 1997). Ainsi, notre laboratoire avait conclu que l'ajout de l'AcM 4LO3311 activait directement les cellules LAK, d'autant plus qu'il avait également été noté que l'AcM 4LO3311 adsorbé au fond des puits d'une plaque de culture provoquait l'exocytose granulaire des cellules LAK de souris BALB/c (Morelli et Lemieux, 1993). En fait, pour savoir si l'effet de l'AcM 4LO3311 sur la lyse des cellules YAC-1 résulte d'une stimulation ou d'un blocage de l'interaction avec un ligand, il faudrait que l'expérience soit reprise avec des fragments F(ab')₂ d'AcM dirigés non pas contre le récepteur mais plutôt contre les ligands H-2K^k ou H-2D^d.

D'autre part, Murphy *et al.* (1995) avaient rapporté que les cellules NK Ly49C⁺ de la souris BALB/c étaient capables de promouvoir la croissance de cellules hématopoïétiques syngéniques en culture, et ce, probablement à cause de leur plus grande capacité de sécrétion de GM-CSF. De plus, ces auteurs avaient confirmé ces résultats dans un contexte *in vivo* en démontrant une augmentation de la prise de greffes syngéniques chez la souris BALB/c lors du co-transfert de cellules Ly49C⁺ avec les cellules de moelle osseuse. Ceci pouvait suggérer que les cellules Ly49C⁺ exerçaient des fonctions activatrices auxquelles le récepteur Ly49C participait peut-être directement

étant donné que ce phénomène n'était pas observé avec les cellules Ly49C⁻. Toutefois, rien dans ces expériences ne démontrait que le signal d'activation induisant la production de GM-CSF était engendré via le récepteur Ly49C. Les cellules utilisées pour ces expériences avaient été cultivées 6 à 8 jours avec 1000 U/ml d'IL-2 avant d'être triées et cultivées à nouveau dans les mêmes conditions pour 2 jours additionnels. Cette procédure est plus que suffisante pour induire la production de cytokines (Levitt *et al.*, 1991).

Tel que mentionné précédemment, quelques auteurs ont plutôt attribué une fonction inhibitrice au récepteur Ly49C. Cependant, il est à noter que plusieurs études portant sur ce récepteur ont été effectuées chez la souris B6 avec l'AcM SW5E6 qui réagit avec deux molécules chez cette souche de souris (Brennan *et al.*, 1996a), ce qui remet en question les résultats obtenus. Toutefois, Yu *et al.* (1996) ont suggéré que le récepteur Ly49C exprimé à la surface des cellules LAK des souris BALB/c et BALB.B était responsable de la transmission d'un signal d'inhibition suite à son engagement par des molécules de classe I du CMH d'haplotype b et d. Selon ces auteurs, le fait que l'ajout de fragments F(ab')₂ de l'AcM SW5E6 dans un test de cytotoxicité renverse l'incapacité de lyse des cellules LAK 5E6⁺ envers des cellules cibles d'haplotypes H-2^b ou H-2^d démontre la fonction inhibitrice du récepteur puisque les fragments d'AcM ajoutés empêchent l'interaction entre celui-ci et son ligand, ce qui bloque la transmission du signal d'inhibition. De même, l'ajout de fragments F(ab')₂ des AcM SW5E6 et 4LO3311 renversait l'incapacité de lyse de cellules LAK de souris BALB.B Ly49C⁺ contre des lymphoblastes d'haplotype H-2^b (T.C. George, communication personnelle). Toutefois, alors que les cellules effectrices de la souris BALB/c ne lysent pas du tout les lymphoblastes H-2^d, un certain niveau de lyse est détecté avec les cellules effectrices de la souris BALB.B. Celles-ci expriment les mêmes allèles Ly49 que la souris BALB/c mais, dans le cas de Ly49C, notre laboratoire a rapporté que le niveau d'expression était quatre fois inférieur sur les cellules NK de BALB.B par rapport à BALB/c (Gosselin *et al.*, 1997). La lyse des lymphoblastes H-2^d mais non H-2^b par les cellules Ly49C⁺ de BALB.B pourrait signifier qu'un seuil plus élevé doit être atteint pour qu'un signal d'inhibition soit émis via ce récepteur lors de son engagement avec un ligand H-2^d. Une inhibition totale de l'activité lytique des cellules Ly49C⁺ ne serait atteinte qu'en situation

d'avidité optimale. Ainsi, un ligand de forte affinité (H-2^b) induirait un tel signal sur une cellule exprimant faiblement le récepteur Ly49C (comme par exemple chez BALB.B) alors qu'un ligand de plus faible affinité (H-2^d) ne serait efficace que dans le cas où la cellule NK exprime fortement le récepteur Ly49C (chez BALB/c mais pas chez BALB.B).

Aussi, la présence d'un motif ITIM dans la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C (Wong *et al.*, 1991) suggère que ce dernier puisse avoir des propriétés inhibitrices. Ce motif est en effet reconnu pour sa capacité à recruter la PTP SHP-1 qui elle-même, intervient dans la transmission d'un signal d'inhibition (D'Ambrosio *et al.*, 1995 ; Doody *et al.*, 1995). De plus, il a été démontré que la tyrosine du motif ITIM présent dans la portion cytoplasmique du récepteur Ly49A devient phosphorylée, suite à une stimulation cellulaire avec un AcM anti-Ly49A, et s'associe avec la PTP SHP-1 (Mason *et al.*, 1997). Bien que ces auteurs aient aussi pu observer la phosphorylation de la tyrosine du motif ITIM du récepteur Ly49C après une stimulation au pervanadate de sodium, ils n'ont pu déceler l'association du récepteur avec la PTP. L'utilisation de l'AcM SW5E6 et de cellules de la souris B6 importe peu ici étant donné la similarité de la portion cytoplasmique des récepteurs Ly49C et Ly49I. Si la structure du récepteur Ly49C supportait une fonction inhibitrice, le recrutement de la PTP requise pour la transmission du signal d'inhibition reste à démontrer.

Finalement, une autre particularité structurale du récepteur Ly49C semblait plutôt indiquer que ce récepteur pouvait transmettre un signal d'activation. La présence d'un acide aminé chargé dans la portion transmembranaire du récepteur nous laissait croire qu'à l'instar du récepteur Ly49D et Ly49H (Smith *et al.*, 1998; Gosselin *et al.*, 1999), le récepteur Ly49C aurait la capacité de recruter une molécule adaptatrice capable d'enclencher un signal d'activation. Cependant, l'acide aminé chargé du récepteur Ly49C est situé à la position 4 de la portion transmembranaire alors que celui des récepteurs Ly49D et Ly49H dont on connaît l'association avec DAP12 est situé à la position 13 (Wong *et al.*, 1991; Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994; Brennan *et al.*, 1994). En ce sens, il a été rapporté dans un autre système que l'interaction de δ -gal avec des mutants

de la molécule Tac contenant une arginine à différentes positions de la partie transmembranaire était dépendante de la position de l'acide aminé chargé (Cosson *et al.*, 1991). La position de l'acide aminé chargé dans la portion transmembranaire du récepteur Ly49C pourrait ne pas permettre l'association de ce dernier avec la molécule DAP12. Par ailleurs, DAP12 n'est sans doute pas la seule protéine adaptatrice capable de s'associer aux récepteurs d'activation des cellules NK. D'ailleurs, Wu *et al.* (1999) viennent de démontrer l'association de CD94/NKG2D avec une nouvelle molécule adaptatrice, DAP10.

Considérant que la présence du motif ITIM dans la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C était une bonne indication de sa capacité à transmettre un signal d'inhibition, nous avons d'abord entrepris d'évaluer la capacité du récepteur à transmettre un signal d'activation. Pour ce faire, nous avons choisi d'étudier en premier lieu la modulation de l'expression des gènes de trois cytokines sécrétées par les cellules NK suite à une stimulation cellulaire via le récepteur Ly49C. Nous avons donc mis au point un protocole de stimulation des cellules utilisant l'AcM 4LO3311 anti-Ly49C adsorbé au fond des puits d'une plaque de culture. Les lysats de cellules ainsi stimulées ont ensuite été analysés par RT-PCR quantitatif et par buvardage de type Northern pour y mesurer la concentration des ARNm spécifiques au TNF- α , à l'IFN- γ et au GM-CSF.

Dès le début de la mise au point du protocole de stimulation, nous avons pu constater que la stimulation des cellules LAK avec l'AcM 2.4G2 anti-Fc γ RIIIa complet induisait une augmentation de la concentration des ARNm spécifiques au TNF- α dans les cellules. Bien que notre laboratoire ait déjà rapporté une augmentation de l'exocytose granulaire à partir de cellules LAK stimulées dans des conditions semblables avec cet AcM (Morelli et Lemieux, 1993), aucune étude n'avait relaté l'effet de l'engagement du récepteur Fc γ RIIIa sur l'expression des gènes de cytokines dans le modèle murin. Nous pouvons donc affirmer ici, sur la base de nos observations, qu'à l'instar du récepteur présent sur les cellules NK/LAK humaines (Anegon *et al.*, 1988), le récepteur Fc γ RIIIa murin est capable d'induire une augmentation de l'expression des gènes du TNF- α et de l'IFN- γ . L'activation observée suite à la stimulation des cellules avec l'AcM 2.4G2 nous

a servi de témoin positif pour la suite du projet et nous a permis d'utiliser les cellules provenant de la souche de souris BALB/c qui expriment plus fortement le récepteur Ly49C. D'autre part, nous n'avons pas jugé nécessaire d'inclure un témoin isotypique pour la stimulation par l'AcM 2.4G2 étant donné que nous ne cherchions qu'à observer un signal positif pouvant nous servir de témoin. Ainsi, que l'AcM 2.4G2 se fixe au récepteur FcγRIIIA par sa portion Fab ou Fc nous importait peu, le signal d'activation observé étant tout de même généré à partir du récepteur FcγRIIIA. L'augmentation de la concentration des ARNm spécifiques à l'IFN-γ observée dans des expériences ultérieures utilisant des fragments F(ab')₂ de l'AcM 2.4G2, nous indique que l'activation résulte vraisemblablement d'une interaction spécifique entre le récepteur et l'AcM.

Nous avons également observé l'augmentation de la concentration intracellulaire des ARNm spécifiques au TNF-α et à l'IFN-γ suite à l'engagement du récepteur Ly49C par l'AcM 4LO3311 (Figure 6 à 10). Ces résultats obtenus d'abord par RT-PCR quantitatif et confirmés par buvardage de type Northern nous indiquaient que ce récepteur possédait effectivement une fonction activatrice. De plus, il semblait que l'augmentation des ARNm spécifiques observée était bien due à l'interaction entre le récepteur Ly49C et l'AcM 4LO3311 puisque le témoin isotypique IgG3 était incapable d'induire une telle augmentation. Aussi, les observations récentes de Gavin *et al.* (1998) à l'effet que seul le récepteur FcγRI murin est capable de lier la portion Fc des immunoglobulines d'isotype IgG3 nous assure que l'effet observé suite à la stimulation avec l'AcM 4LO3311 ne pouvait être attribuable à l'interaction de l'AcM avec le récepteur FcγRIIIA. D'autre part, la concentration des ARNm spécifiques du GM-CSF est restée à un niveau basal suite à la stimulation des cellules par l'AcM 4LO3311 (Figure 9). Ceci peut paraître en contradiction avec les résultats de Murphy *et al.* (1995) mais s'explique possiblement par le choix de la période d'incubation pour le dosage des ARNm du GM-CSF car l'augmentation de la concentration de ceux-ci n'est perceptible qu'à partir de 8 h de stimulation avec le PMA et l'ionophore calcique A23187 (Figure 9).

Suite à l'obtention de ces résultats, nous avons envisagé quelques possibilités pouvant soutenir l'hypothèse d'une ambivalence fonctionnelle pour le récepteur Ly49C.

L'association du récepteur Ly49C avec d'autres molécules est l'une de ces possibilités. À cet égard, il est intéressant de faire un parallèle avec les récepteurs CD94/NKG2 exprimés à la surface des cellules NK chez l'homme et les rongeurs. Ces récepteurs sont en fait des hétérodimères formés de la chaîne CD94 et de l'une des molécules de la famille NKG2 (revu par Lopez-Botet et Bellon, 1999). Tout comme les récepteurs Ly49, les récepteurs CD94/NKG2 sont apparentés à la superfamille des lectines de type C; ils ont pour ligand des molécules de classe Ib du CMH (Braud *et al.*, 1998; Vance *et al.*, 1998). Dans les cellules NK humaines, la molécule CD94 peut s'associer, entre autres, aux molécules NKG2A et NKG2C, formant ainsi des récepteurs aux propriétés antagonistes (Houchins *et al.*, 1997). En effet, le récepteur CD94/NKG2A est reconnu comme un récepteur d'inhibition au même titre que le récepteur Ly49A. De plus, le signal d'inhibition engendré suite à l'engagement du récepteur CD94/NKG2A est transmis de la même façon : phosphorylation sur tyrosine du motif ITIM, recrutement de la PTP SHP-1 et inhibition subséquente de la phosphorylation sur tyrosine (Carratero *et al.*, 1998; LeDréan *et al.*, 1998). Par contre, le récepteur CD94/NKG2C est pour sa part reconnu comme un récepteur d'activation. L'engagement de ce récepteur induit la phosphorylation de la tyrosine du motif ITAM présent dans la molécule DAP12 qui est associée à la molécule NKG2C grâce à la présence de résidus d'acides aminés chargés dans la portion transmembranaire de l'une et l'autre des deux molécules. La phosphorylation sur tyrosine du motif ITAM mène au recrutement de PTK qui sont responsables de la transmission du signal d'activation (Lanier *et al.*, 1998b). Le récepteur CD94/NKG2C doit donc ses propriétés activatrices à la molécule adaptatrice DAP12, comme c'est le cas pour le récepteur Ly49D et pour le récepteur Ly49H. Dès lors, il serait possible que la dualité fonctionnelle hypothétique du récepteur Ly49C soit due, par exemple, à son association préférentielle soit en homodimères, soit en hétérodimères avec une autre molécule adaptatrice. Comme c'est le cas pour le récepteur Ly49D (Smith *et al.*, 1998), une molécule adaptatrice pourrait également s'associer avec des homodimères Ly49C.

Une autre possibilité serait que l'engagement du récepteur Ly49C menant probablement au recrutement subséquent des PTP SHP-1 et SHP-2 génère des signaux qui régulent négativement l'activité cytotoxique mais qui régulent positivement

l'expression des gènes de cytokines. Alors que la PTP SHP-1 serait impliquée dans la transmission du signal d'inhibition, la PTP SHP-2 pourrait, ainsi qu'il a déjà été démontré chez l'humain, servir dans ce cas-ci de molécule adaptatrice servant au recrutement d'autres molécules possédant des propriétés activatrices (Li *et al.*, 1994; Tonks et Neel, 1996). En ce sens, le cas du récepteur 2B4 humain est intéressant. En effet, il a été rapporté que ce récepteur peut transmettre un signal d'activation à la cellule qui l'exprime suite à son engagement par un AcM (Tangye *et al.*, 1999). De plus, les mêmes auteurs ont également démontré l'association de ce récepteur avec les molécules SHP-2 et SAP. Bien que l'implication de ces deux molécules dans la signalisation à partir du récepteur 2B4 humain ne soit pas encore bien comprise, il semble que SHP-2 et SAP soient en compétition pour l'association au récepteur, ce qui pourrait constituer un mode de régulation de l'activité NK. Il est donc possible que la PTP SHP-2 soit impliquée, dans ce cas-ci, dans la transmission d'un signal d'activation.

Finalement, il pourrait exister à la surface des cellules NK, différentes molécules homologues au récepteurs Ly49C dont la portion extracellulaire serait semblable mais dont la portion cytoplasmique serait différente. Dans les cellules NK humaines, les récepteurs p58 (KIR2DL) ont été identifiés comme des récepteurs d'inhibition ayant pour ligands des molécules de classe I du CMH (revu par Moretta *et al.*, 1999). Les récepteurs KIR2DL font partie de la superfamille des immunoglobulines et transmettent un signal d'inhibition de la même façon que les récepteurs CD94/NKG2A et Ly49A (revu par Lanier, 1998). Cependant, des formes tronquées de ces récepteurs ont également été identifiées à la surface des cellules NK. Ces isoformes, appelées p50 (KIR2DS), ont une portion cytoplasmique plus courte que celle des récepteurs p58 et n'ont pas de motif ITIM. Les récepteurs p50 reconnaissent également des molécules de classe I du CMH mais contrairement aux p58, transmettent un signal d'activation (revu par Moretta *et al.*, 1999). Encore une fois, ces récepteurs doivent leurs propriétés activatrices à la molécule DAP12 à laquelle ils sont associés grâce à l'attraction des charges portées par des acides aminés transmembranaires (Lanier *et al.*, 1998a). Chez la souris, le récepteur Ly49D ne possède pas de motif ITIM et transmet un signal d'activation (Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994; Mason *et al.*, 1996). Cependant, ce récepteur ne peut être considéré

comme une forme tronquée du récepteur Ly49C. Par contre, en plus du récepteur d'activation Ly49H qui possède une portion extracellulaire à 90% homologue à celle de Ly49C, nous savons maintenant que parmi les cinq nouveaux gènes *Ly49* identifiés par McQueen *et al.* (1998), il y en a trois, qui semblent être très homologues au récepteur Ly49C. Deux n'ont pas de motif ITIM (*Ly49k* et *Ly49n*) et pourraient constituer des homologues activateurs du récepteur Ly49C. Par contre, il est peu probable que la stimulation avec l'AcM 4LO3311 ait engendré un signal d'activation à partir de ces molécules étant donné que la séquence prédite en acides aminés de celles-ci ne contient pas de lysine en position 129 de la tige et dont la présence est critique pour la réactivité de l'anticorps (Gene Bank, numéros d'accès AF028131 et AF08128; Lian *et al.*, 1999). De plus, les gènes *Ly49k* et *Ly49n* pourraient bien ne pas produire de récepteurs fonctionnels puisqu'aucun transcrit complet de ces gènes n'a pu être détecté (McQueen *et al.*, 1999). Il est également improbable que l'effet de la stimulation par l'AcM 4LO3311 soit dû à une réactivité avec le récepteur Ly49H étant donné que des cellules transfectées avec l'ADNc de ce récepteur n'ont pu lier l'AcM. Par contre, comme les trois récepteurs « Ly49C-like » dont nous venons de faire mention n'ont pour l'instant été identifiés que chez la souris B6 et comme l'étude des molécules Ly49 nous a appris que le polymorphisme est un phénomène commun dans cette famille de gènes, il est possible que les cellules NK de la souris BALB/c expriment des allèles des récepteurs Ly49K et/ou Ly49N et/ou Ly49H fonctionnels à leur surface et que ces récepteurs très homologues à Ly49C soient reconnus par l'AcM 4LO3311. Vu le degré d'homologie de ces molécules, on peut aussi envisager l'existence d'hétérodimères Ly49C/Ly49K, Ly49C/Ly49N ou Ly49C/Ly49H dont les propriétés seraient ambivalentes. Il est à noter que la découverte, tant chez l'homme que chez la souris, d'isoformes activatrices de récepteurs d'inhibition portant un motif ITIM et ayant également pour ligands des molécules de classe I du CMH va à l'encontre de l'hypothèse de l'absence du soi et intrigue actuellement plusieurs chercheurs (Cambiaggi *et al.*, 1999).

Pour tenter d'éclaircir les circonstances dans lesquelles le récepteur Ly49C pourrait transmettre un signal d'inhibition ou un signal d'activation, nous avons entrepris

de tester l'effet de deux AcM anti-Ly49C sur la concentration des ARNm spécifiques à l'IFN- γ .

5.3 Comparaison de l'effet de deux AcM anti-Ly49C

Quelle que soit la réalité quant à la transmission du signal à partir du récepteur Ly49C, nous voulions trouver une explication sur l'utilité physiologique d'un récepteur exhibant une ambivalence fonctionnelle potentielle. Sachant que le récepteur Ly49C est le récepteur Ly49 qui possède la plus vaste gamme de ligands, nous avons voulu vérifier si la nature du signal transmis à partir de ce récepteur pouvait dépendre de la portion de la molécule engagée par différents ligands. Pour simuler ceci, nous avons incubé les cellules LAK avec les AcM AcM 4LO3311 et SW5E6 qui reconnaissent des épitopes différents du récepteur Ly49C. En effet, l'AcM 4LO3311 reconnaît un épitope situé dans la tige du récepteur à proximité du CRD alors que l'AcM SW5E6 reconnaît un épitope situé dans le CRD (Brennan *et al.*, 1996a ; Lian *et al.*, 1999). De plus, ces deux portions du récepteur seraient impliquées dans la reconnaissance d'au moins un ligand (Brennan *et al.*, 1996b). En utilisant le protocole de stimulation indirecte, c'est-à-dire l'incubation avec des AcM anti-Ly49C solubles suivie d'une incubation avec des fragments F(ab')₂ d'un anticorps de chèvre anti-IgG de souris, nous avons généré les résultats présentés à la Figure 11. La mesure de la concentration des ARNm par RT-PCR nous montrait bel et bien une différence entre l'effet des deux AcM, indiquant que contrairement à l'AcM 4LO3311, l'AcM SW5E6 était incapable d'induire la transmission d'un signal d'activation via le récepteur Ly49C. Nous avons alors supposé que la différence observée pouvait refléter les conséquences de l'engagement du récepteur par différents ligands : par exemple, un ligand se liant à la tige du récepteur pourrait induire la transmission d'un signal d'activation alors qu'un ligand se liant au CRD pourrait induire la transmission d'un signal d'inhibition.

Pour en revenir aux possibilités retenues de transmission de signaux positifs et négatifs énoncées dans la section précédente, l'hypothèse selon laquelle la portion du récepteur engagée par différents ligands influence la nature du signal transmis peut se

concrétiser de plusieurs façons. D'une part, un récepteur Ly49C associé à une molécule adaptatrice pourrait, suite à son engagement, être phosphorylé sur la tyrosine du motif ITIM (signal d'inhibition) ou du motif ITAM porté par la molécule adaptatrice (signal d'activation) selon la nature du ligand rencontré et ce, à condition que l'une et l'autre des tyrosines servent de substrat à des kinases différentes. Par ailleurs, l'engagement du récepteur Ly49C par des ligands liant la tige ou le CRD pourrait se traduire par un recrutement préférentiel de la PTP SHP-1 ou de la PTP SHP-2, la nature du signal transmis dépendrait alors de la PTP recrutée par le récepteur. Finalement, des isoformes du récepteur Ly49C possédant des propriétés antagonistes pourraient se lier à des ligands différents.

Dans une perspective moins intéressante, la différence observée dans l'effet provoqué par les deux AcM anti-Ly49C pourrait être simplement due à une différence reliée aux AcM eux-mêmes, l'un étant activateur et l'autre pas, comme il a déjà été observé, par exemple, pour des AcM dirigés contre la molécule CD2 (Van Lier, Brouwer et Aarden, 1988).

En retenant la possibilité que l'engagement du récepteur Ly49C par différents ligands influence la nature du signal transmis, nous pouvons poser l'hypothèse que le récepteur Ly49C puisse envoyer un signal d'inhibition suite à son engagement par des molécules de classe I de certains haplotypes et envoyer un signal d'activation suite à son engagement par des molécules de classe I d'autres haplotypes. De cette façon, le récepteur pourrait reconnaître positivement certaines molécules de classe I, ce qui enclencherait un signal d'activation menant à la lyse de la cellule cible à moins que celle-ci puisse engager simultanément d'autres récepteurs d'inhibition, inhibant ainsi le processus lytique de la cellule NK. Ainsi qu'il a été proposé pour le récepteur Ly49D (George *et al.*, 1999), ce mode de fonctionnement fournirait une voie d'activation directe lors d'une rencontre avec une cellule cible non protégée par les molécules de classe I adéquates ou, dans le cas d'une cellule cible protégée, activerait des PTK responsables de la phosphorylation sur tyrosine du motif ITIM d'un récepteur d'inhibition engagé simultanément et du recrutement subséquent de la PTP SHP-1.

Quoi qu'il en soit, nous n'avons pas pu approfondir ces possibilités étant donné qu'en changeant la méthode d'analyse pour le buvardage de type Northern, nous avons été incapables de reproduire les résultats de la Figure 11. Nous avons continué à utiliser cette dernière méthode d'analyse étant donné qu'elle contient moins de sources d'erreurs que le RT-PCR quantitatif. En effet, l'absence de standard interne dans la phase de transcription inverse, qui est l'étape la plus variable de la procédure (Freeman *et al.*, 1999), constituait une source majeure d'incertitude dans l'analyse par RT-PCR quantitatif. Ceci dit, l'analyse d'échantillons stimulés avec des AcM complets par la technique du buvardage de type Northern nous a montré à nouveau le pouvoir activateur de l'AcM 4LO3311 (Figure 12).

Toujours dans le but de comparer l'effet de deux AcM anti-Ly49C, nous avons changé le protocole de stimulation une fois de plus et avons testé l'effet de fragments $F(ab')_2$ des AcM 4LO3311 et 5GA5 sur la concentration des ARNm de l'IFN- γ . Pour des raisons pratiques, nous avons changé de témoin isotypique pour ce protocole de stimulation, nous avons testé en parallèle l'effet du nouveau témoin isotypique (4LO439) dans une stimulation avec des AcM complets. Étonnamment, nous avons observé une augmentation de la concentration des ARNm suite à la stimulation avec l'AcM 4LO439 complet (Figure 13). Cet AcM qui reconnaît l'allèle de B6 du récepteur Ly49G2 ne réagit pas, en cytométrie en flux, avec les cellules NK de la souris BALB/c (Figure 3). L'activation observée suite à la stimulation par cet AcM devait donc être non spécifique, ce qui nous a fait douter des résultats que nous avons obtenus jusque là avec l'AcM 4LO3311 qui pouvait peut-être, lui aussi, activer les cellules de façon non spécifique. Étant donné que l'AcM 4LO439 a tout de même été produit contre des cellules NK, il était possible que l'activation cellulaire résultant de la stimulation par cet AcM soit due à une réactivité croisée de l'AcM avec une protéine activatrice exprimée à la surface des cellules. D'autre part, la stimulation des cellules avec les fragments $F(ab')_2$ des AcM 4LO3311 et 5GA5 n'a pas donné de résultats encourageants. Bien que nous ayons observé une légère augmentation de la concentration des ARNm de l'IFN- γ dans l'échantillon stimulé avec les fragments de l'AcM 4LO3311 dans l'expérience présentée à la Figure 14, nous n'avons pas détecté une telle augmentation dans deux autres

expériences identiques. L'activation perçue dans l'échantillon stimulé avec les fragments $F(ab')_2$ de l'AcM 2.4G2 nous a indiqué que l'adsorption des fragments $F(ab')_2$ à la plaque de stimulation ne faisait pas défaut. Il est cependant possible que la capacité d'adsorption des fragments $F(ab')_2$ ait été différente pour les IgG de rat (2.4G2), de souris (4LO3311) et de hamster (5GA5).

Les résultats inquiétants obtenus avec l'AcM 4LO439 complet nous ont poussé à essayer un autre témoin isotypique pour vérifier si l'activation des cellules NK par l'AcM 4LO3311 que nous avons observé dans de très nombreuses expériences était spécifique ou non. L'AcM A.1.9 (anti-glycoprotéine S1 du coronavirus murin, obtenu du Dr P.J. Talbot) purifié par notre laboratoire a donc été utilisé comme témoin isotypique de l'AcM 4LO3311 dans une expérience de stimulation utilisant des cellules LAK triées sur la base de leur expression du récepteur Ly49C (Figure 14). Étant donné que l'infection avec le coronavirus est assez fréquente chez la souris, nous nous sommes assurés de l'absence de réactivité de l'AcM avec les cellules LAK des souris BALB/c en cytométrie en flux. L'activation observée suite à la stimulation avec les AcM 4LO3311 et A.1.9 tant dans les cellules $Ly49C^+$ que dans les cellules $Ly49C^-$ met sérieusement en doute que l'effet de la stimulation avec l'AcM 4LO3311 soit spécifique (Figure 15).

Il semble bien que l'élément responsable de l'activation cellulaire dans les échantillons stimulés avec l'AcM 4LO3311 provient de la préparation d'AcM. En effet, l'AcM de source commerciale (IgG3) que nous avons utilisé pour la majorité des expériences n'a jamais réussi à induire une augmentation de la concentration intracellulaire des ARNm des cytokines à l'étude. Mis à part cet AcM commercial, les deux autres AcM d'isotype IgG3 purifiés par notre laboratoire et utilisés comme témoins isotypiques ont provoqué une activation non spécifique des cellules. La dimérisation spontanée des immunoglobulines d'isotype IgG3 est un phénomène connu (Greenspan *et al.*, 1992). Par contre, nous ne savons pas encore si ce phénomène peut être responsable de l'activation non spécifique observée dans les échantillons stimulés avec ce type d'AcM ou si celle-ci est plutôt due à un contaminant présent dans la préparation d'AcM. Même si l'activation non spécifique que nous avons observé était due à la présence de dimères

d'IgG3 dans nos préparations d'AcM, il serait peu probable que cette activation soit engendrée via le récepteur FcγRIIIA étant donné que celui-ci ne peut pas plus lier les IgG3 sous forme de complexes que sous forme monomérique (Gavin *et al.*, 1998). Nous devons donc identifier l'élément responsable de l'activation non spécifique avant de reprendre l'expérimentation avec ces AcM.

Pour l'instant, nous ne pouvons ni supporter ni exclure la capacité activatrice du récepteur Ly49C. Ses propriétés fonctionnelles restent donc ambivalentes et exigent une clarification.

5.4 Phosphorylation sur tyrosine des protéines cytoplasmiques

Avant d'en arriver à la conclusion énoncée à la fin de la section précédente, nous avons cherché à savoir si des PTK étaient impliquées dans la transmission du signal d'activation que nous avons observé suite à l'engagement du récepteur Ly49C par l'AcM 4LO3311. Étant donné le rôle prépondérant joué par ce type d'enzyme dans l'initiation des signaux menant à l'activation des cellules NK murines (voir chapitre 2), nous avons pensé que l'étude de la phosphorylation sur tyrosine des protéines cellulaires nous fournirait un système de choix pour éclaircir les propriétés de transduction du récepteur Ly49C. Dans des conditions de stimulation permettant d'observer une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine dans les cellules stimulées via le récepteur FcγRIIIA (Figure 16), nous n'avons jamais pu mettre en évidence une telle augmentation dans les cellules stimulées via le récepteur Ly49C. Par contre, les résultats obtenus suite à la stimulation des cellules dans ces conditions avec l'AcM 2.4G2 n'étaient pas toujours constants.

Le manque de reproductibilité de la technique peut être dû à plusieurs facteurs. D'abord, les cellules que nous avons utilisées constituent une population très hétérogène qui, contrairement aux cellules d'une lignée cellulaire, peuvent répondre de façon très différente d'une expérience à l'autre et même à l'intérieur d'une même expérience si l'on considère le nombre élevé de sous-populations de cellules NK définies, entre autres, par l'expression des différents récepteurs Ly49 (Kubota *et al.*, 1999). D'autre part, la

phosphorylation sur tyrosine des protéines cellulaires est un phénomène transitoire. Étant donné l'hétérogénéité des différentes cultures de cellules primaires utilisées, il est fort possible que les conditions optimales de stimulation varient d'une expérience à l'autre. Aussi, il est vraisemblable que l'augmentation de la concentration des ARNm spécifiques observée précédemment suite à la stimulation via le récepteur Ly49C résultait d'une activation non spécifique. Comme le type de stimulation utilisé ici est très différent de celui utilisé pour la mesure des ARNm, il est probable que l'élément activateur inconnu (s'il était présent ici) enclenche une voie signalétique qui n'implique pas les PTK. Finalement, si cet élément activateur était absent dans ce type de stimulation, les résultats obtenus suite à la stimulation des cellules avec l'AcM 4LO3311 sont peut-être valables et ceci nous indiquerait que si le récepteur Ly49C possède bel et bien une fonction activatrice, celle-ci ne se manifeste pas non plus par l'intermédiaire des PTK. Cependant, nous n'avons pas obtenu de résultats assez clairs pour discriminer entre l'une ou l'autre de ces possibilités et nous ne pouvons pas conclure ici non plus quant à la capacité activatrice du récepteur Ly49C.

5.5 Protéines associées aux récepteurs Ly49

La présence du motif ITIM dans la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C nous a mené à réaliser, en parallèle avec les expériences portant sur la capacité activatrice du récepteur, une autre série d'expériences visant à vérifier si le motif ITIM du récepteur Ly49C était fonctionnel. À cet effet, nous avons tenté d'identifier, en collaboration avec le laboratoire du Dr Pascale Duplay, des molécules de signalisation associées au récepteur Ly49C. Nous avons donc procédé à l'analyse des interactions possibles entre les protéines cytoplasmiques contenues dans un lysat de cellules RNK-16 et une protéine de fusion contenant la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C. Nous avons également analysé les interactions possibles avec des protéines de fusion contenant les portions cytoplasmiques des récepteurs Ly49A, Ly49G2 et Ly49H. Les premiers résultats obtenus nous indiquaient la présence de deux protéines associées aux protéines de fusion contenant la portion cytoplasmiques des récepteurs Ly49A, G2 et C et ce, uniquement lorsque celles-ci étaient phosphorylées sur tyrosine (Figure 17). Considérant l'interaction

connue entre les récepteurs Ly49A et G2 avec les PTP SHP-1 et SHP-2 dans de telles circonstances (Olcese *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1997; Mason *et al.*, 1997), nous avons analysé les mêmes échantillons par immunobuvardage et avons identifié ces deux protéines comme étant SHP-1 et SHP-2 (Figure 18). Ces résultats confirment des observations rapportées par d'autres dans le cas des récepteurs Ly49A et G2 mais démontrent pour la première fois l'association du récepteur Ly49C, ou du moins de sa portion cytoplasmique phosphorylée, avec ces deux PTP. Ceci nous indique donc que le motif ITIM porté par le récepteur Ly49C est fonctionnel et a la capacité de recruter, au même titre que les récepteurs Ly49A et G2, ces deux enzymes. De plus, le recrutement des deux PTP par la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C est dépendant de la phosphorylation sur tyrosine de ce dernier (Figure 18) et est donc attribuable au motif ITIM puisque la seule tyrosine présente dans la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C se trouve à l'intérieur de ce motif (Wong *et al.*, 1991). D'autre part, les résultats obtenus avec la protéine de fusion contenant la portion cytoplasmique du récepteur Ly49H ne sont pas surprenant non plus. Aucune protéine associée à cette protéine de fusion n'a été détectée par Far Western, la phosphorylation sur tyrosine de la portion cytoplasmique du récepteur Ly49H étant impossible à cause de l'absence de tyrosine dans cette portion du récepteur (Brennan *et al.*, 1994). De plus, nous savons depuis peu que ce récepteur possède une fonction activatrice (Gosselin *et al.*, 1999).

Cette partie du projet nous a permis de vérifier que le motif ITIM porté par la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C pouvait, lorsque phosphorylé sur tyrosine, recruter les PTP SHP-1 et SHP-2. Sachant le rôle joué par la PTP SHP-1 dans le signal d'inhibition transmis notamment par le récepteur Ly49A, il est clair que le récepteur Ly49C a également la capacité de transmettre un signal menant à l'inhibition des fonctions cellulaires. En considérant toujours l'hypothèse selon laquelle le récepteur Ly49C serait ambivalent, nous espérons détecter d'autres protéines associées au récepteur Ly49C. Toutefois, la technique de buvardage de type Far Western que nous avons utilisée n'est pas des plus sensibles et permet surtout la détection d'interactions protéiques de forte avidité étant donné que la détection nécessite une association entre une protéine soluble et une protéine dénaturée fixée sur une membrane. De plus, l'emploi

d'une protéine de fusion ne contenant que la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C ne nous permettait pas de détecter des protéines qui seraient associées à la portion transmembranaire du récepteur comme c'est le cas pour le récepteur Ly49D (Mason *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). Quoi qu'il en soit, nous avons décidé de vérifier si l'interaction observée entre la portion cytoplasmique du récepteur Ly49C et les PTP SHP-1 et SHP-2 pouvait se produire dans un contexte *in situ*.

5.6 Phosphorylation sur tyrosine des récepteurs Ly49

La démonstration de l'association entre le récepteur Ly49C et les PTP SHP-1 et SHP-2 ayant été faite dans un système utilisant des protéines de fusion, nous voulions confirmer cette association dans un contexte plus physiologique, à l'intérieur des cellules LAK de la souris BALB/c. Pour ce faire, nous avons voulu vérifier en premier lieu si le récepteur Ly49C natif pouvait être phosphorylé sur tyrosine. Nous avons effectivement observé une phosphoprotéine de 65 kD immunoprécipitée par l'AcM 4LO3311 à partir de cellules stimulées au pervanadate de sodium (Figure 19 et 20). L'action du pervanadate de sodium étant intracellulaire, nous en avons conclu que la phosphotyrosine détectée devait être celle du motif ITIM du récepteur Ly49C. À titre de témoin, nous avons également précipité le récepteur Ly49G2 phosphorylé sur tyrosine à partir d'un lysat de cellules B6 aussi stimulées au pervanadate (Figure 20). La différence dans l'intensité du signal de détection des deux phosphoprotéines s'explique par le fait que contrairement au récepteur Ly49C, le récepteur Ly49G2 possède trois résidus tyrosine dans sa portion cytoplasmique (Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994). Suivant le protocole élaboré par Mason *et al.* (1997), nous avons étudié l'effet d'une stimulation par l'AcM 4LO3311 sur la phosphorylation sur tyrosine du récepteur Ly49C. Nous n'avons pu détecter de forme phosphorylée du récepteur dans ces conditions, ce qui n'est pas vraiment étonnant puisqu'il n'y avait pas d'étape de «cross-linking» dans ce protocole de stimulation. En ajoutant une telle étape au protocole, nous avons détecté la présence de la PTP SHP-1 dans les immunoprécipités obtenus avec les AcM 4LO3311 et 4LO439 à partir de cellules stimulées avec le pervanadate ou avec les mêmes AcM (Figure 21). Bien que nous n'ayons pu démontrer la phosphorylation des récepteurs dans cette expérience, la

présence de la même bande dans les extraits totaux nous indiquait que la réaction de l'anticorps anti-SHP-1 était bien spécifique. Les résultats que nous avons obtenus auparavant nous ont permis de vérifier la phosphorylation sur tyrosine du récepteur Ly49C après une stimulation au pervanadate, ce qui nous laisse croire que suite à une telle stimulation, le récepteur Ly49C devient phosphorylé sur tyrosine et recrute la PTP SHP-1. Dans le cas de la stimulation par l'AcM 4LO3311, la situation est moins claire et des expériences devront être reprises pour confirmer la phosphorylation du récepteur Ly49C dans de telles conditions de stimulation.

Ces expériences, bien qu'elles soient incomplètes, tendent tout de même à confirmer la capacité du récepteur Ly49C à être phosphorylé sur tyrosine dans le contexte du motif ITIM et à recruter la PTP SHP-1 qui avait été observée dans le système utilisant des protéines de fusion. Nous pouvons donc supposer qu'à l'instar des récepteur Ly49A et Ly49G2, le récepteur Ly49C peut transmettre un signal d'inhibition à la cellule qui l'exprime grâce au recrutement et à l'activation de la PTP SHP-1.

6. CONCLUSIONS

Bien que nous ayons observé à de très nombreuses reprises une augmentation de la concentration des ARNm spécifiques au TNF- α et à l'IFN- γ dans les échantillons de cellules LAK de souris BALB/c stimulées avec l'AcM 4LO3311, nous ne pouvons pas confirmer la capacité du récepteur Ly49C à transmettre un signal menant à l'activation des fonctions cellulaires. En effet, l'activation observée dans les échantillons cellulaires stimulés avec les AcM d'isotype IgG3 purifiés dans notre laboratoire semble être principalement due à un élément inconnu présent dans les préparations d'AcM. Nous ne pouvons toutefois pas exclure qu'un signal d'activation soit généré de façon spécifique à partir du récepteur Ly49C suite à sa ligation par l'AcM 4LO3311. Il pourrait donc y avoir dans les échantillons stimulés avec cet AcM une partie de l'activation qui soit non spécifique, ainsi qu'en témoigne les résultats obtenus avec les cellules Ly49C⁻ et une partie spécifique de l'AcM. Pour clarifier ceci, nous devons déterminer si la cause de l'activation non spécifique générée suite à la stimulation avec l'AcM 4LO3311 est attribuable à la présence d'IgG3 sous forme dimérique ou si elle est attribuable à un contaminant d'une autre nature dans nos préparations d'AcM. À cet égard, il serait pertinent de purifier nos AcM dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la purification de l'AcM d'isotype IgG3 de source commerciale qui a servi de témoin dans plusieurs expériences, c'est-à-dire par chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

Nous ne pouvons pas conclure non plus quant à la capacité du récepteur Ly49C à induire une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine des protéines cellulaires suite à son engagement par l'AcM 4LO3311. Il ne s'agit pas, dans ce cas-ci, d'un problème de non spécificité mais plutôt d'un problème de reproductibilité. La variabilité des résultats générés par cette technique nous a laissé croire que cette approche n'était pas adéquate et nous l'avons laissé tomber. Une solution qui pourrait être envisager pour régler ce problème serait l'utilisation d'une lignée cellulaire transfectée avec l'ADNc du récepteur Ly49C.

Même si nous n'avons pas pu démontrer si le récepteur Ly49C a ou non la capacité de transmettre un signal d'activation à la cellule qui l'exprime, les caractéristiques structurales de ce récepteur de même que les propriétés qui lui ont été attribuées antérieurement, suggèrent tout de même une dualité fonctionnelle. Dans l'éventualité où nous pourrions confirmer la capacité activatrice du récepteur, les possibilités énoncées au chapitre précédent quant à son fonctionnement pourraient être considérées.

D'un autre côté, nous avons aussi voulu évaluer la capacité du récepteur Ly49C à transmettre un signal d'inhibition. Dans un système utilisant des protéines de fusion, nous avons effectivement pu observer l'association des PTP SHP-1 et SHP-2 à la portion cytoplasmique de ce récepteur lorsque celle-ci était phosphorylée sur tyrosine dans le contexte du motif ITIM, ce qui n'avait jamais été démontré. Considérant la fonction connue de la PTP SHP-1 dans la transmission d'un signal d'inhibition, nous pouvons conclure qu'à l'instar du récepteur Ly49A, le récepteur Ly49C possède toutes les caractéristiques nécessaires à la transmission d'un signal d'inhibition. Cependant, l'association de la portion cytoplasmique phosphorylée du récepteur avec la PTP SHP-2 pourrait avoir une toute autre signification physiologique.

Nous avons finalement cherché à démontrer l'association du récepteur Ly49C avec les deux PTP dans un contexte *in situ*, à l'intérieur des cellules LAK de souris BALB/c. Nous avons effectivement pu mettre en évidence l'association spécifique de SHP-1 avec Ly49C suite à une stimulation cellulaire. Même si les expériences qui ont mené à cette conclusion sont incomplètes, il semble bien que le récepteur Ly49C dans sa forme native a également la possibilité de transmettre un signal d'inhibition. Par contre, l'association du récepteur natif avec SHP-2 n'a pas encore été évaluée dans ce contexte.

En résumé, nous avons pu apporter des arguments en faveur de la capacité inhibitrice du récepteur Ly49C en démontrant son association probable avec la PTP SHP-1, mais n'avons pas réussi à confirmer ou infirmer sa capacité à transmettre un signal d'activation.

LISTE DE RÉFÉRENCES

AL-AOUKATY A., B. ROLSTAD et A.A. MAGHAZACHI. 1997. Functional coupling of NKR-P1 receptors to various heterotrimeric G proteins in rat interleukin-2- activated natural killer cells. *J Biol Chem* **272** : 31604-31608.

ANEGON I., M.C. CUTURI, G. TRINCHIERI et B. PERUSSIA. 1988. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med* **167** : 452-472.

ARASE H., N. ARASE et T. SAITO. 1996. Interferon γ production by natural killer (NK) cells and NK1.1⁺ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J Exp Med* **183** : 2391-2396.

ARASE N., H. ARASE, S.Y. PARK, H. OHNO, C. RA et T. SAITO. 1997. Association with FcR γ is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1⁺ T cells. *J Exp Med* **186** : 1957-1963.

ASEA A et J. STEIN-STREILEIN. 1998. Signalling through NK1.1 triggers NK cells to die but induces NK T cells to produce interleukin-4. *Immunology* **93** : 296-305.

AUBRY J.P., S. POCHON, J.F. GAUCHAT, A. NUEDA-MARIN, V.M. HOLERS, P. GRABER, C. SIEGFRIED et J.Y. BONNEFOY. 1994. CD23 interacts with a new functional extracytoplasmic domain involving N-linked oligosaccharides on CD21. *J Immunol* **152** : 5806-5813.

BELL G.M., G.M. DETHLOFF et J.B. IMBODEN. 1993. CD45-negative mutants of a rat natural killer cell line fail to lyse tumor targets cells. *J Immunol* **151** : 3646-3653.

BEZOUSKA K., G. VLAHAS, O. HORVATH, G. JINOCCHOVA, A. FISEROVA, R. GIORDA, W.H. CHAMBERS, T. FEIZI et M. POSPISIL. 1994a. Rat natural killer cell antigen, NKR-P1, related to C-type animal lectins is a carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* **269** : 16945-16952.

BEZOUSKA K., C.-T. YUEN, J. O'BRIEN, R.A. CHILDS, W. CHAI, A.M. LAWSON, K. DRBAL, A. FISEROVA, M. POSPISIL et T. FEIZI. 1994b. Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity. *Nature* **372** : 150-157.

BIASSONI R., A. PESSINO, C. BOTTINO, D. PENDE, L. MORETTA et A. MORETTA. 1999. The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* **29** : 1014-1020.

BINSTADT B.A., K.M. BRUMBAUGH, C.J. DICK, A.M. SCHARENBERG, B.L. WILLIAMS, M. COLONNA, L.L. LANIER, J.-P. KINET, R.T. ABRAHAM et P.J. LIEBSON. 1996. Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* **5** : 629-638.

BONNEMA J.D., L.M. KARNITZ, R.A. SHOON, R.T. ABRAHAM et P.J. LIEBSON. 1994. Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol-3 kinase in natural killer cells is associated with protein kinase C- independent granule release and cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* **180** : 1427-1435.

BRAUD V.M., D.S. ALLAN, C.A. O'CALLAGHAN, K. SÖDERSTRÖM, A. D'ANDRÉA, G.S. OGG, S. LAZETIC, N.T. YOUNG, J.I. BELL, J.H. PHILLIPS, L.L. LANIER et A.J. McMICHAEL. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptor CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391** : 795-799.

BRENNAN J., D. MAGER, W. JEFFERIES et F. TAKEI. 1994. Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties. *J Exp Med* **180** : 2287-2295.

BRENNAN J., F. TAKEI, S. WONG et D.L. MAGER. 1995. Carbohydrate recognition by a natural killer cell receptor, Ly-49C. *J Biol Chem* **270** : 9691-9694.

BRENNAN J., S. LEMIEUX, J.D. FREEMAN, D.L. MAGER et F. TAKEI. 1996a. Heterogeneity among Ly-49C natural killer (NK) cells : characterization of highly related receptors with differing functions and expression patterns. *J Exp Med* **184** : 2085-2090

BRENNAN J., G. MAHON, D.L. MAGER, W.A. JEFFERIES et F. TAKEI. 1996b. Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by Ly-49 : specificities and domain interactions. *J Exp Med* **183** : 1553-1559.

BROWN M.G., A.A. SCALZO, K. MATSUMOTO et W.M. YOKOYAMA. 1997. The natural killer gene complex : a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* **155** : 53-65.

BROWN M.H., K. BOLES, P.A. van der MERWE, V. KUMAR, P.A. MATTHEW et A.N. BARCLAY. 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48 . *J Exp Med* **188** : 2083-2090.

CAMBIAGGI A., M. LUCAS, E. VIVIER et F. VÉLY. 1999. The enigma of activating isoforms of ITIM-bearing molecules. *Curr Top Microbiol Immunol* **244** : 169-176.

CAMBIER J.C. 1995. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* **155** : 3281-3285.

- CAMPBELL K.S. et R. GIORDA. 1997. The cytoplasmic domain of rat NKR-P1 receptor interacts with the N-terminal domain of p56^{lck} via cysteine residues. *Eur J Immunol* **27** : 72-77.
- CARLYLE J.R., A. MARTIN, A. MEHRA, L. ATTISANO, F.W. TSUI et J.C. ZUNIGA-PFLUCKER. 1999. Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function. *J Immunol* **162** : 5917-5923.
- CARRATERO M., G. PALMIERI, M. LLANO, V. TULLIO, A. SANTONI, D.E. GERAGHTY et M. LOPEZ-BOTET. 1998. Specific engagement of the CD94/NKG2A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur J Immunol* **28** : 1280-1291.
- CASSATELLA M.A., I. ANEGON, M.C. CUTURI, P. GRISKEY, G. TRINCHIERI et B. PERUSSIA. 1989. FcγR (CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositides turnover in human natural killer cells. Role of Ca²⁺ in FcγR (CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med* **169** : 549-567.
- CHAMBERS W.H., N.L. VUJANOVIC, A.B. DELEO, M.W. OLSZOWY, R.B. HERBERMAN et J.C. HISERODT. 1989. Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med* **169** : 1373-1389.
- CHAN P.Y. et F. TAKEI. 1989. Molecular cloning and characterization of a novel murine T cell surface antigen, YE1/48. *J Immunol* **142** : 1727-1736.
- CHANG C., A. RODRIGUEZ, M. CARRETERO, M. LOPEZ-BOTET, J.H. PHILLIPS et L.L. LANIER. 1995. Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur J Immunol* **25** : 2433-2437.
- CHANG C.S., L. SHEN, D.-E. GONG et K.P. KANE. 1996. Major histocompatibility complex class I-dependent cell binding to isolated Ly-49A : evidence for high-avidity interaction. *Eur J Immunol* **26** : 3219-3223.
- CHANG C.S. et K.P. KANE. 1998. Evidence for sulfate modification of H-2D^d on N-linked carbohydrate (s) : possible involvement in Ly-49A interaction. *J Immunol* **160** : 4367-4374.
- COLIGAN J.E., A.M. KRUISBEEK, D.H. MARGULIES, E.M. SHEVACH et W. STROBER. 1991. Current Protocols in Immunology. Unit 3.12. Proliferative assays for T cell function. John Wiley & Sons Inc., USA.
- CORREA I., et D.H. RAULET. 1995. Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity* **2** : 61-71.

- COSSON P., S.P. LANKFORD, J.S. BONIFACINO et R.D. KLAUSNER. 1991. Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature* **351** : 414-416.
- DAËRON M. 1997. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* **15** : 203-234.
- D'AMBROSIO D., K.L. HIPPEN, S.A. MINSKOFF, I. MELLMAN, G. PANI, K.A. SIMINOVITCH et J.C. CAMBIER. 1995. Recruitment and activation of PTP-1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc γ RIIBI. *Science* **268** : 293-297.
- DANIELS B.F., F.M. KARLHOFER, W.E. SEAMAN et W.M. YOKOYAMA. 1994a. A natural killer cell receptor specific for a major histocompatibility complex class I molecule. *J Exp Med* **180** : 687-692.
- DANIELS B.F., M.C. NAKAMURA, S.D. ROSEN, W.M. YOKOYAMA et W.E. SEAMAN. 1994b. Ly-49A, a receptor for H-2D^d, has a functional carbohydrate recognition domain. *Immunity* **1** : 785-792.
- DEPATIE C., A. CHALIFOUR, C. PARÉ, S.-H. LEE, S.M. VIDAL et S. LEMIEUX. 1999. Assessment of *Cmy1* candidates by genetic mapping and *in vivo* antibody depletion of NK cell subsets. *Int Immunol* **11** : sous presse.
- DISSEN E., J.C. RYAN, W.E. SEAMAN et S. FOSSUM. 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* **183** : 2197-2207.
- DOODY G.M., L.B. JUSTEMENT, C.C. DELIBRIAS, R.J. MATTHEWS, J. LIN, M.L. THOMAS et D.T. FEARON. 1995. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* **269** : 242-244.
- FLEMING J.O., S.A. STOHLMAN, R.C. HARMON, M.M.C. LAI, J.A. FRELINGER et L.P. WEINER. 1983. Antigenic relationships of murine coronaviruses: analysis using monoclonal antibodies to JHM (MHV-4) virus. *Virology* **131** : 296-307.
- FREEMAN W.M., S.J. WALKER et K.E. VRANA. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* **26** : 112-125.
- GARNI-WAGNER B.A., A. PUROHIT, P.A. MATHEW, M. BENNETT et V. KUMAR. 1993. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* **151** : 60-70.
- GAVIN A.L., N. BARNES, H.M. DISSTELBLOEM et P.M. HOGARTH. 1998. Identification of the mouse IgG3 receptor : implication of antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity. *J Immunol* **160** : 20-23.

GEORGE T.C., L.H. MASON, J.R. ORTALDO, V. KUMAR et M. BENNETT. 1999. Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells. *J Immunol* **162** : 2035-2043.

GIORDA R., W.A. RUDERT, C. VAVASSORI, W.H. CHAMBERS, J.C. HISERODT et M. TRUCCO. 1990. NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science* **249** : 1298-1300.

GIORDA R. et M. TRUCCO. 1991. Mouse NKR-P1 : a family of genes selectively coexpressed in adherent lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* **147** : 1701-1708.

GIORDA R., E.P. WEISBERG, T.K. IP et M. TRUCCO. 1992. Genomic structure and strain-specific expression of the natural killer cell receptor NKR-P1. *J Immunol* **149** : 1957-1963.

GOLD M.R., D.A. LAW et A.L. DeFRANCO. 1990. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor. *Nature* **345** : 810-813.

GOSSELIN P., Y. LUSIGNAN et S. LEMIEUX. 1992. Evidence that the 4LO3311 mAb recognizes the NK-2.1 antigen and preliminary characterization of the molecule. 6th Spring Meeting of the Canadian Society for Immunology (Mont Rolland, 13-16 mars 1992). Résumé # 10.6.

GOSSELIN P., Y. LUSIGNAN et S. LEMIEUX. 1993. The murine NK2.1 antigen : a 130 kD glycoprotein dimer expressed by a natural killer cell subset of the spleen, thymus and lymph nodes. *Mol Immunol* **30** : 1185-1193.

GOSSELIN P., Y. LUSIGNAN, J. BRENNAN, F. TAKEI et S. LEMIEUX. 1997. The NK2.1 receptor is encoded by Ly-49C and its expression is regulated by MHC class I alleles. *Int Immunol* **9** : 533-540.

GOSSELIN P., L.H. MASON, J. WILLETTE-BROWN, J.R. ORTALDO, D.W. McVICAR et S.K. ANDERSON. 1999. Induction of DAP12 phosphorylation, calcium mobilization, and cytokine secretion by Ly49H. *J Leukoc Biol* **66** : 165-171.

GREENSPAN N.S. et L.J. COOPER. 1992. Intermolecular cooperativity: a clue to why mice have IgG3? *Immunol Today* **13** : 164-?

GUMPERZ J.E. et P. PARHAM. 1995. The enigma of natural killer cell. *Nature* **378** : 245-248.

HANKE T., H. TAKIZAWA, C.W. McMAHON, D.H. BUSCH, E.G. PAMER, J.D. MILLER, J.D. ALTMAN, Y. LIU, D. CADDO, F.A. LEMONNIER, P.J. BJORKMAN et D.H. RAULET. 1999. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity* **11** : 67-77.

HELD W., J. ROLAND et D.H. RAULET. 1995. Allelic exclusion of Ly49 family genes encoding class I-MHC-specific receptors on NK cells. *Nature* **376** : 355-358.

HELD W., J.R. DORFMAN, M.-F. WU et D.H. RAULET. 1996. Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur J Immunol* **26** : 2286-2292.

HELD W. et D.H. RAULET. 1997. Expression of the Ly49A gene in murine natural killer cell clones is predominantly but not exclusively mono-allelic. *Eur J Immunol* **27** : 2876-2884.

HELD W. et B. KUNZ. 1998. An allele-specific, stochastic gene expression process controls the expression multiple Ly49 family genes and generates a diverse, MHC-specific NK cell receptor repertoire. *Eur J Immunol* **28** : 2407-2416.

HERBERMAN R.B., M. E. NUNN et D.H. LARVIN. 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* **16** : 216-229.

HOUCHINS J.P., L.L. LANIER, E. NIEMI, J.H. PHILLIPS et J.C. RYAN. 1997. Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* **158** : 3603-3609.

HULETT M.D. et P.H. HOGARTH. 1994. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* **57** : 1-127.

IDRIS A.H., H.R. SMITH, L.H. MASON, J.R. ORTALDO, A.A. SCALZO et W.M. YOKOYAMA. 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* **96** : 6330-6335.

JOHANSSON M.H., E. HOGLUND, M.C. NAKAMURA, J.C. RYAN et P. HOGLUND. 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* **28** : 4198-4206.

KANAKARAJ P., B. DUCKWORT, L. AZZONI, M. KAMOUN, L.C. CANTLEY et B. PERUSSIA. 1994. Phosphatidylinositol-3 kinase activation induced upon Fc γ RIIIA-ligand interaction. *J Exp Med* **179** : 551-558.

KANE K.P. 1994. Ly-49 mediates EL-4 lymphoma adhesion to isolated class I major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* **179** : 1011-1015.

KARLHOFFER F.M. et W.M. YOKOYAMA. 1991. Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. *J Immunol* **146** : 3662-3673.

- KARLHOFFER F.M., R.K. RIBAUDO et W.M. YOKOYAMA. 1992. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49⁺ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* **358** : 66-70.
- KARLHOFFER F.M., R. HUNZIKER, A. REICHLIN, D.H. MARGULIES et W.M. YOKOYAMA. 1994. Host MHC class I molecules modulate in vivo expression of NK cell receptor. *J Immunol* **153** : 2407-2416.
- KIESSLING R., E. KLEIN et H. WIGZELL. 1975. Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* **5** : 112-117.
- KIM S. et W.M. YOKOYAMA. 1998. NK cell granule exocytosis and cytokine production inhibited by Ly-49A engagement. *Cell Immunol* **183** : 106-112.
- KLAUSNER R.D. et L.E. SAMELSON. 1991. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell* **64** : 875-878.
- KOO G.C. et J.R. PEPPARD. 1984. Establishment of monoclonal anti-NK1.1 antibody. *Hybridoma* **3** : 301-303.
- KUBO S., Y. ITOH, N. ISHIKAWA, R. NAGASAWA, T. MITARAI et N. MARUYAMA. 1993. The gene encoding the mouse lymphocyte antigen Ly-49 : structural analysis and the 5'-flanking sequence. *Gene* **136** : 329-331.
- KUBOTA A., S. KUBOTA, S. LOHWASSER, D.L. MAGER et F. TAKEI. 1999. Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice. *J Immunol* **163** : 212-216.
- KUNG S.K.P. et R.G. MILLER. 1995. The NK1.1 antigen in NK-mediated F1 antiparent killing in vitro. *J Immunol* **154** : 1624-1633.
- KUNG S.K., R.C. SU, J. SHANNON et R.G. MILLER. 1999. The NKR-P1B gene product is an inhibitory receptor on SJL/J NK cells. *J Immunol* **162** : 5876-5887.
- LANIER L.L., C. CHANG et J.H. PHILLIPS. 1994. Human NKR-P1A : a disulfide linked homodimer of C-type lectin superfamily expressed by a subset NK and T lymphocytes. *J Immunol* **153** : 2417-2428.
- LANIER L.L. 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* **16** : 359-393.
- LANIER L.L., B.C. CORLISS, J. WU, C. LEONG et J.H. PHILLIPS. 1998a. ImmunoReceptor DAP12 bearing tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* **391** : 703-707.
- LANIER L.L., B. CORLISS, J. WU et J.H. PHILLIPS. 1998b. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* **8** : 693-701.

- LATCHMAN Y., P.F. MCKAY et H. REISER. 1998. Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J Immunol* **161** : 5809-5812.
- LEIBSON P.J., D.E. MIDTCHUN, K.P. WINDEBANK et R.T. ABRAHAM. 1990. Transmembrane signaling during natural killer cell-mediated cytotoxicity. Regulation by protein kinase C activation. *J Immunol* **145** : 1498-1504.
- LEIBSON P.J. 1997. Signal transduction during natural killer cell activation : inside the mind of a killer. *Immunity* **6** : 655-661.
- LE DRÉAN E., F. VÉLY, L. OLCESE, A. CAMBIAGGI, S. GUIA, G. KRYSTAL, N. GERVOIS, A. MORETTA, F. JOTEREAU et E. VIVIER. 1998. Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* **28** : 264-276.
- LEVITT L.J., A. NAGLER, F. LEE, J. ABRAMS, M. SHATSKY et D. THOMPSON. 1991. Production of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor by human natural killer cells. *J Clin Invest* **88** : 67-75.
- LI W., R. NISHIMURA, A. KASHISHIAN, A.G. BATZER, W.J.H. KIM, A.J. COOPER et J. SCHLESSINGER. 1994. A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **14** : 509-517.
- LIAN R.H., J.D. FREEMAN, D.L. MAGER et F. TAKEI. 1998. Role of conserved glycosylation site unique to murine class I MHC in recognition by Ly-49 NK cell receptor. *J Immunol* **161** : 2301-2306.
- LIAN RH., Y. LI, S. KUBOTA, D.L. MAGER et F. TAKEI. 1999. Recognition of class I MHC by NK receptor Ly-49C : identification of critical residues. *J Immunol* **162** : 7271-7276.
- LIAO F., H.S. SHIN et S.G. RHEE. 1993. Cross-linking of Fc γ RIIIA on natural killer cells results in tyrosine phosphorylation of PLC- γ 1 and PLC- γ 2. *J Immunol* **150** : 2668-2674.
- LJUNGGREN H.-G. et K. KÄRRE. 1990. In search of the « missing self » : MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11** : 237-244.
- LEMIEUX S., F. OUELLET-TALBOT, Y. LUSIGNAN, L. MORELLI, N. LABRECHE, P. GOSSELIN et J. LECOMPTE. 1991. Identification of murine natural killer cell subsets with monoclonal antibodies derived from 129 anti-C57BL/6 immune spleen cells. *Cell Immunol* **134** : 191-204.

- LOHWASSER S., P. HANDE, D.L. MAGER et F. TAKEI. 1999. Cloning of murine NKG2A, B and C: second family of C-type lectin receptors on murine NK cells. *Eur J Immunol* **29** : 755-761.
- LOPEZ-BOTET M. et T. BELLON. 1999. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* **11** : 301-307
- MASON L., S.L. GIARDINA, T. HECHT, J. ORTALDO et B.J. MATHIESON. 1988. LGL-1: a non-polymorphic antigen expressed on a major population of mouse natural killer cells. *J Immunol* **140** : 4403-4412.
- MASON L.H., J.R. ORTALDO, H.A. YOUNG, V. KUMAR, M. BENNETT et S.K. ANDERSON. 1995. Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1 : a member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). *J Exp Med* **182** : 293-303.
- MASON L.H., S.K. ANDERSON, W.M. YOKOYAMA, H.R.C. SMITH, R. WINKLER-PICKETT et J.R. ORTALDO. 1996. The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *J Exp Med* **184** : 2119-2128.
- MASON L.H., P. GOSELIN, S.K. ANDERSON, W.E. FOGLER, J.R. ORTALDO et D.W. McVICAR. 1997. Differential tyrosine phosphorylation of inhibitory versus activating Ly-49 receptor proteins and their recruitment of SHP-1 phosphatase. *J Immunol* **159** : 4187-4196.
- MASON L.H., J. WILLETTE-BROWN, S.K. ANDERSON, P. GOSELIN, E.W. SHORES, P.E. LOVE, J.R. ORTALDO et D.W. McVICAR. 1998. Characterization of an associated 16-kDa tyrosine phosphoprotein required for Ly-49D signal transduction. *J Immunol* **160** : 4148-4152.
- MATHEW P.A., B.A. GARNI-WAGNER, K. LAND, A. TAKASHIMA, E. STONEMAN, M. BENNETT et V. KUMAR. 1993. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* **151** : 5328-5337.
- MATSUMOTO N., R.K. RIBAUDO, J.-P. ABASTADO, D.H. MARGULIES et W.M. YOKOYAMA. 1998. The lectin-like NK cell receptor Ly-49A recognizes a carbohydrate-independent epitope on its MHC class I ligand. *Immunity* **8** : 245-254.
- McQUEEN K.L., J.D. FREEMAN, F. TAKEI et D.L. MAGER. 1998. Localization of five new Ly49 genes, including three closely related to Ly49C. *Immunogenetics* **48** : 174-183.
- McQUEEN K.L., S. LOHWASSER, F. TAKEI et D.L. MAGER. 1999. Expression analysis of new Ly49 genes : most transcripts with Ly49J lack the transmembrane domain. *Immunogenetics* **49** : 685-691.

McVICAR D.W., L.S. TAYLOR, P. GOSSELIN, J. WILLETTE-BROWN, A.I. MIKHAEL, R.L. GEAHLEN, M.C. NAKAMURA, P. LINNEMEYER, W.E. SEAMAN, S.K. ANDERSON, J.R. ORTALDO et L.H. MASON. 1998. DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **273** : 32934-32942.

MORELLI L., Y. LUSIGNAN et S.LEMIEUX. 1992. Heterogeneity of natural killer cell subsets NK-1.1⁺ and NK-1.1⁻ inbred mouse strains and their progeny. *Cell Immunol* **141** : 148-160.

MORELLI L. et S. LEMIEUX. 1993. Triggering of the cytotoxic activity of murine natural killer and lymphokine-activated killer cells through the NK2.1 antigen. *J Immunol* **151** : 6783-6793.

MORETTA A., C. BOTTINO, R. MILLO et R. BIASSONI. 1999. HLA-specific and non-HLA-specific human NK receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* **244** : 69-84.

MURPHY W.J., A. RAZIUDDIN, L. MASON, V. KUMAR, M. BENNETT et D.L. LONGO. 1995. NK cell subsets in the regulation of murine hematopoiesis. 1. 5E6⁺ NK cells promote hematopoietic growth in H-2^d strain mice. *J Immunol* **155** : 2911-2917.

NAGASAWA R., J. GROSS, O. KANAGAWA, K. TOWNSEND, L.L. LANIER, J. CHILLER et J.P. ALLISON. 1987. Identification of a novel T cell surface disulfide-bonded dimer distinct from the alpha/beta antigen receptor. *J Immunol* **138** : 815-824.

NAKAJIMA H., M. CELLA, H. LANGEN, A. FRIEDLEIN et M. COLONNA. 1999. Activating interactions in human NK cell recognition: the role of 2B4-CD48. *Eur J Immunol* **29** : 1676-1683.

NAKAMURA M.C., E.C. NIEMI, M.J. FISHER, L.D. SHULTZ, W.E. SEAMAN et J.C. RYAN. 1997. Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in natural killer cell cytotoxicity and functionally associates with the SHP-1 tyrosine phosphatase. *J Exp Med* **185** : 673-684.

NAKAMURA M.C., P.A. LINNEMEYER, E.C. NIEMI, L.H. MASON, J.R. ORTALDO, J.C. RYAN et W.E. SEAMAN. 1999. Mouse Ly-49D recognizes H-2D^d and activates natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* **189** : 493-500.

NISHIMURA A., M. MORITA, Y. NISHIMURA et Y. SUGINO. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl Ac Res* **18** : 6169.

OLCESE L., P. LANG, F. VÉLY, A. CAMBIAGGI, D. MARGUET, M. BLÉRY, K.L. HIPPEN, R. BIASSONI, A. MORETTA, L. MORETTA, J.C. CAMBIER et E. VIVIER. 1996. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP-1C and PTP-1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* **156** : 4531-4534.

OLSSON M.Y., K. KÄRRE et L. SENTMAN. 1995. Altered phenotype and function of natural killer cells expressing the major histocompatibility complex receptor Ly-49 in mice transgenic for its ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 1649-1653.

OLSSON-ALHEIM M.Y., J. SUNDBÄCK, K. KÄRRE et C.L. SENTMAN. 1999. The MHC class I molecule H-2D^p inhibits murine NK cells via the inhibitory receptor Ly49A. *J Immunol* **162** : 7010-7014.

ORIHUELA M., D.H. MARGULIES et W.M. YOKOYAMA. 1996. The NK cell receptor Ly-49A recognizes a peptide-induced conformational determinant on its MHC class I ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 11792-11797.

O'SHEA J.J., D.W. McVICAR, T.L. BAILEY, C. BURNS et M.J. SMYTH. 1992. Activation of peripheral blood T lymphocytes by pharmacological induction of protein-tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89** : 110306-10310.

ORTALDO J.R., L.H. MASON, T.A. GREGORIO, J. STOLL et R.T. WINKLER-PICKETT. 1997. The Ly-49 family : regulation of cytokine production in murine NK cells. *J Leukoc Biol* **62** : 381-388.

PARÉ C. 1995. Étude de la distribution et des propriétés fonctionnelles d'un antigène spécifique des cellules NK murines à l'aide d'anticorps monoclonaux xénogéniques. Mémoire de maîtrise. Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval, Québec. 155 pages.

PERUSSIA B. 1991. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokine. *Curr Opin Immunol* **3** : 49-55.

PERUSSIA B. 1998. Fc receptors on natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **230** : 63-88.

PESSINO A., S. SIVORI, C. BOTTINO, A. MALASPINA, L. MORELLI, L. MORETTA, R. BIASSONI et A. MORETTA. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* **188** : 953-960.

POGGI A., A. RUBARTELLI, L. MORETTA et M.R. ZOCCHI. 1997. Expression and function of NKRP1A molecule on human monocytes and dendritic cells. *Eur J Immunol* **27** : 2965-2970.

POGGI A., P. COSTA, E. TOMASELLO et L. MORETTA. 1998. IL-12-induced up-regulation of NKRP1A expression in human NK cells and consequent NKRP1A-mediated down-regulation of NK cell activation. *Eur J Immunol* **28** : 1611-1616.

RAVETCH J.V. et J.-P. KINET. 1991. Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **9** : 457-492.

- RAZIUDDIN A., D.L. LONGO, L. MASON, J.R. ORTALDO, M. BENNETT et W.J. MURPHY. 1998. Differential effects of the rejection of bone marrow allografts by the depletion of activating versus inhibiting Ly-49 natural killer cell subsets. *J Immunol* **160** : 87-94.
- REICHLIN A. et W.M. YOKOYAMA. 1998. Natural killer cell proliferation induced by anti-NK1.1 and IL-2. *Immunol Cell Biol* **76** : 143-152.
- RENARD V., A. CAMBIAGGI, F. VÉLY, M. BLÉRY, L. OLCESE, S. OLIVERO, M. BOUCHET et E. VIVIER. 1997. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells : a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* **155** : 205-221.
- RETH M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* **338** : 383-384.
- REYNOLDS C.W., E.W. BERE JR. et J.M. WARD. 1984. Natural killer activity in the rat. III. Characterization of transplantable large granular lymphocyte (LGL) leukemias in the F344 rat. *J Immunol* **132** : 534-540.
- ROCHET N., P. ANDERSON et E. VIVIER. 1992. Structure et fonction du complexe CD16 : ζ : γ des cellules NK. *Médecine/Sciences* **8** : 359-365.
- ROLAND J. et P.A. CAZENAVE. 1992. Ly-49 antigen defines an alpha beta TCR population in i-IEL with an extrathymic maturation. *Int Immunol* **4** : 699-706.
- RYAN J.C., J. TURCK, E.C. NIEMI, W.M. YOKOYAMA et W.E. SEAMAN. 1992. Molecular cloning of the NK1.1 antigen, a member of the NKR-P1 family of natural killer cell activation molecules. *J Immunol* **149** : 1631-1635.
- RYAN J.C. et W.E. SEAMAN. 1997. Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells. *Immunol Rev* **155** : 79-89.
- SALCEDO M., H.D. DIEHL, M.Y. OLSSON-ALHEIM, J. SUNDBÄCK, L. VAN KAER, K. KÄRRE et H.-G. LJUNGGREN. 1997. Altered expression of Ly49 inhibitory receptors on natural killer cells from MHC class I-deficient mice. *J Immunol* **158** : 3174-3180.
- SAMBROOK J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SANCHEZ-MEJORADA, G. et C. ROSALES. 1998. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol* **63** : 521-33.

SAYOS J., C. WU, M. MORRA, N. WANG, X. ZHANG, D. ALLEN, S. VAN SCHAİK, L. NOTARANGELO, R. GEHA, M.G. RONCAROLO, H. OETTGEN, J.E. De VRIES, G. AVERSA et C. TERHORST. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395** : 462-469.

SCHATZLE J.D., S. SHEU, S.E. STEPP, P.A. MATTHEW, M. BENNETT et V. KUMAR, 1999. Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 3870-3875.

SCRIBA A., M. SCHNEIDER, V. GRAU, P.H. van der MEIDE et B. STEINIGER. 1997. Rat monocytes up-regulate NKR-P1A and down-modulate CD4 and CD43 during activation in vivo: monocyte subpopulations in normal and IFN-gamma-treated rats. *J Leukoc Biol* **62** : 741-752.

SECRIST J.P., L. A. BURNS, L. KARNITZ, G.A. KORETZKY et R.T. ABRAHAM. 1993. Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor pervanadate, on T-cell activation events. *J Biol Chem* **268** : 5886-5893.

SENTMAN C.L., J.J.R. HACKETT, V. KUMAR et M. BENNETT. 1989. Identification of a subset of murine natural killer cells that mediates rejection of Hh-1^d but not Hh-1^b bone marrow grafts. *J Exp Med* **170** : 191-202.

SILVER E.T., J.F. ELLIOTT et K.P. KANE. 1996. Alternatively spliced Ly-49D and H transcripts are found in IL-2-activated NK cells. *Immunogenetics* **44** : 478-482.

SILVER E.T., J.C. LAU et K.P. KANE. 1999. Molecular cloning of mouse NKG2A and C. *Immunogenetics* **49** : 727-730.

SIVORI S., M. VITALE, L. MORELLI, L. SANSEVERINO, R. AUGUGLIARO, C. BOTTINO, L. MORETTA et A. MORETTA. 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* **186** : 1129-1136.

SIVORI S., D. PENDE, C. BOTTINO, E. MARCENARO, A. PESSINO, R. BIASSONI, L. MORETTA et A. MORETTA. 1999. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* **29** : 1656-1666.

SMITH H.R.C., F.M. KARLHOFFER et W.M. YOKOYAMA. 1994. Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated NK cells. *J Immunol* **153** : 1068-1079.

SMITH K.M., J. WU, A.B.H. BAKKER, J.H. PHILLIPS et L.L. LANIER. 1998. Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *J Immunol* **161** : 7-10.

- STONEMAN E.R., M. BENNETT, J. AN, K.A. CHESNUT, E.K. WAKELAND, J.B. SHEERER, M.J. SICILIANO, V. KUMAR et P.A. MATHEW. 1995. Cloning and characterization of 5E6 (Ly-49C), a receptor molecule expressed on a subset of murine natural killer cells. *J Exp Med* **182** : 305-313.
- SUNDBÄCK J., K. KÄRRE et C.L. SENTMAN. 1996. Cloning of minimally divergent allelic forms of the natural killer (NK) receptor Ly-49C, differentially controlled by host genes in the MHC and NK gene complexes. *J Immunol* **157** : 3936-3942.
- SUNDBÄCK J., M.C. NAKAMURA, M. WALDENSTRÖM, E.C. NIEMI, W.E. SEAMAN, J.C. RYAN et K. KÄRRE. 1998. The $\alpha 2$ domain of H-2D^d restricts the allelic specificity of the murine NK cell inhibitory receptor Ly-49A. *J Immunol* **160** : 5971-5978.
- TAKASUGI M., M.R. MICKEY et P.I. TERASAKI. 1973. Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res* **33** : 2898-2902.
- TAKEI F., J. BRENNAN et D.L. MAGER. 1997. The Ly-49 family : genes, proteins and recognition of class I MHC. *Immunol Rev* **155** : 67-77.
- TANGYE S.G., S. LAZETIC, E. WOOLLATT, G.R. SUTHERLAND, L.L. LANIER et J.H. PHILLIPS. 1999. Human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol* **162** : 6981-6985.
- TESTI R., J.H. PHILLIPS et L.L. LANIER. 1989. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C. *J Immunol* **142** : 1854-1860.
- TONKS N.K. et B.G. NEEL. 1996. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* **87** : 365-368.
- TRINCHIERI G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* **47** : 187-376.
- UNKELESS J.C. 1979. Characterisation of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* **150** : 580-596.
- VANCE R.E., J.R. KRAFT, J.D. ALTMAN, P.E. JENSEN et D.H. RAULET. 1998. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med* **188** : 1841-1848.
- VAN LIER R.A.W., M. BROUWER et L.A. AARDEN. 1988. Signals involved in T cell activation. T cell proliferation induced through the synergistic action of anti-CD28 and anti-CD2 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* **18** : 167-172.

VÉLY F. et E. VIVIER. 1997. Conservation of structural features reveals the existence of a large of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J Immunol* **159** : 2075-2077.

VERCELLI D., B. HELM, P. MARSH, E. PADLAN, R.S. GEHA et H. GOULD. 1989. The B-cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* **338** : 649-651.

VICARI A.P. et A. ZLOTNIK. 1996. Mouse NK1.1⁺ T cells : a new family of T cells. *Immunol Today* **17** : 71-76.

VIVIER E., P. MORIN, C. O'BRIEN, B. DRUKER, S.F. SCHLOSSMAN et P.A. ANDERSON. 1991. Tyrosine phosphorylation of the FcγRIII (CD16) ζ_n complex in human natural killer cells. Induction by antibody dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J Immunol* **146** : 206-210.

WALDENSTRÖM M., J. SUNDBÄCK, M.Y. OLSSON-ALHEIM, A. ACHOUR et K. KÄRRE. 1998. Impaired MHC class I (H-2D^d)-mediated protection against Ly-49A⁺ NK cells after amino acid substitutions in the antigen binding cleft. *Eur J Immunol* **28** : 2872-2881.

WEIS W.I., M.E. TAYLOR et K. DRICKAMER. 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* **163** : 19-34.

WESTGAARD I.H., S.F. BERG, S. ORSTAVIK, S. FOSSUM et E. DISSEN. 1998. Identification of a human member of the Ly-49 multigene family. *Eur J Immunol* **28** : 1839-1846.

WONG S., J.D. FREEMAN, C. KELLEHER, D. MAGER et F. TAKEI. 1991. Ly-49 multigene family. New members of a superfamily of type II membrane proteins with lectin-like domains. *J Immunol* **147** : 1417-1423.

WU J., Y. SONG, A.B. BAKKER, S. BAUER, T. SPIES, L.L. LANIER et J.H. PHILLIPS. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* **285** : 730-732.

YE J., J.R. ORTALDO, K. CONLON, R. WINKLER-PICKETT et H.A. YOUNG. 1995. Cellular and molecular mechanisms of IFN-γ production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. *J Leukoc Biol* **58** : 225-233.

YOKOYAMA W.M., L.B. JACOBS, O. KANAGAWA, E.M. SHEVACH et D.I. COHEN. 1989. A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins. *J Immunol* **143** : 1378-1386.

YOKOYAMA W.M., P.J. KEHN, D.I. COHEN et E.M. SHEVACH. 1990. Chromosomal location of the Ly-49 (A1-YE1/48) multigene family. Genetic association with the NK1.1 antigen. *J Immunol* **145** : 2353-2358.

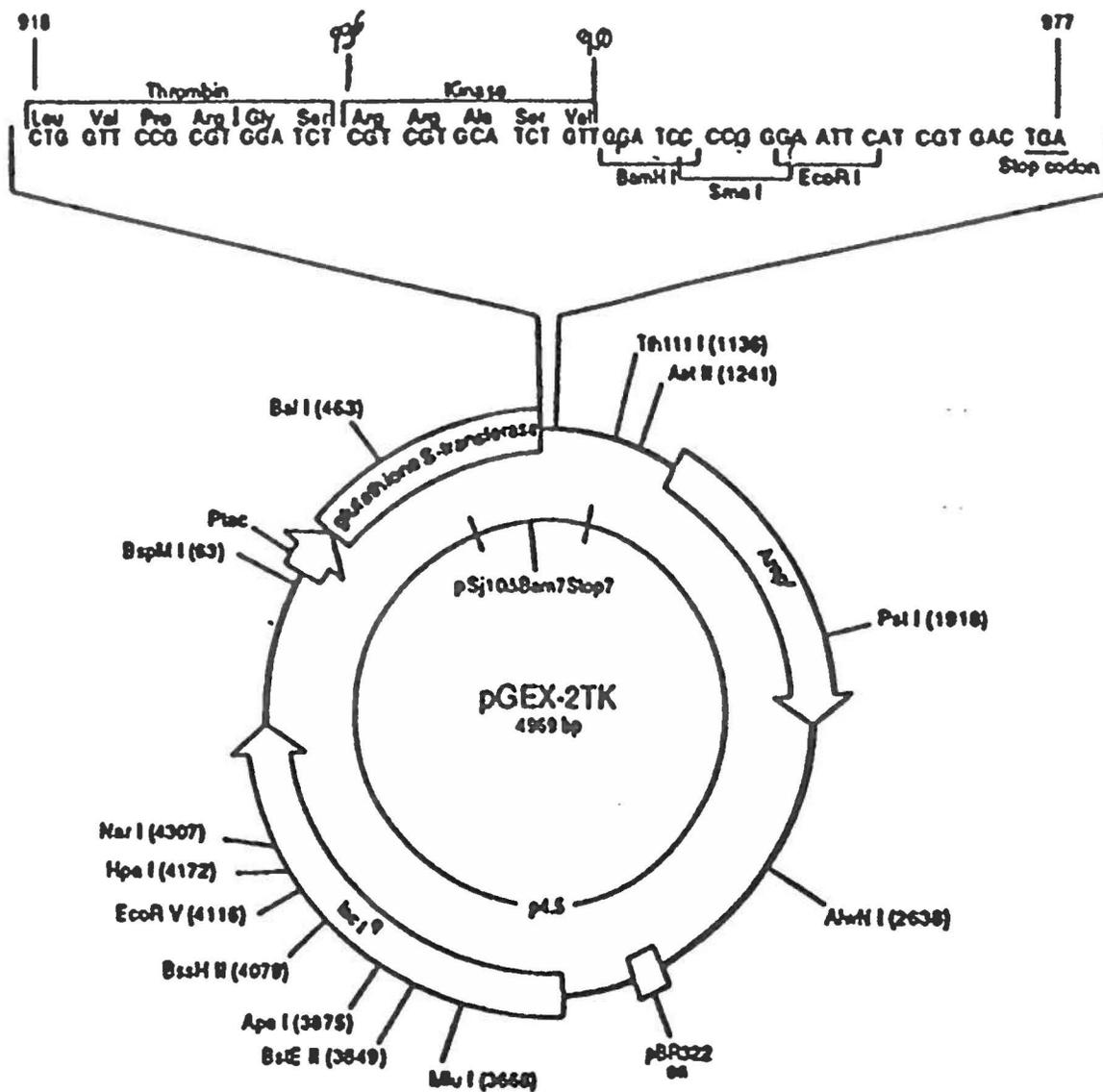
YOKOYAMA W.M., J.C. RYAN, J.J. HUNTER, H.R.C. SMITH, M. STARK et W.E. SEAMAN. 1991. cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with Ly-49 : identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6. *J Immunol* **147** : 3229-3236.

YOKOYAMA W.M. 1993. Recognition structures on natural killer cells. *Curr Opin Immunol* **5** : 67-73.

YOKOYAMA W.M. et W.E. SEAMAN. 1993. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells : the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* **11** : 613-635.

YU Y.Y.L., T. GEORGE, J.R. DORFMAN, J. ROLAND, V. KUMAR et M. BENNETT. 1996. The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts. *Immunity* **4** : 67-76.

ANNEXE 1. CARTE GÉNOMIQUE DU PLASMIDE pGEX-2TK



ANNEXE II. COMMUNICATIONS

GIRARD S., P. DUPLAY et S. LEMIEUX. Ly-49C: a bifunctional NK cell receptor? 12th Spring Meeting of the Canadian Society for Immunology, Sainte-Adèle, Québec, 13-16 mars 1998. Présentation par affiche (résumé 9.13) et participation à un atelier (CSI Workshop : Activation and signal transduction in leukocytes).

GIRARD S. et S. LEMIEUX. Ambivalence fonctionnelle du récepteur Ly-49C des cellules NK murines. 39^{ème} Réunion Annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Bécancour, Québec, 16-18 octobre 1997. Résumé publié dans *Médecin/Sciences* **13 (supp. 2) : 22 (P-003)**.