

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE**

par

CATHERINE PARÉ

**ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION ET DES PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES
D'UN ANTIGÈNE SPÉCIFIQUE DES CELLULES NK MURINES À L'AIDE
DE NOUVEAUX ANTICORPS MONOCLONAUX XÉNOGÉNIQUES**

NOVEMBRE 1995

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
SOMMAIRE.....	x
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES ET PHÉNOTYPIQUES DES CELLULES NK.....	3
2.ACTIVITÉ LYTIQUE DES CELLULES NK.....	5
2.1 Cytotoxicité cellulaire spontanée ou directe.....	5
2.2 Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps.....	6
2.3 Lyse redirigée	7
2.4 Mécanismes lytiques communs	8
3.MÉCANISMES DE RECONNAISSANCE ET DE RÉGULATION DE LA LYSE.....	9
4.MOLÉCULES FONCTIONNELLES DES CELLULES NK MURINES.....	12
4.1 NKR-P1.....	12
4.2 NK1.1.....	14
4.3 LGL-1.....	15
4.4 5E6.....	16
4.5 2B4.....	17
4.6 NK2.1.....	19
5.IMPLICATIONS DES ANTIGÈNES DE CLASSE I DU CMH	20
5.1 Cellules NK versus molécules de classe I	20
5.1.1 Corrélation entre l'expression des molécules de classe I et la susceptibilité à la lyse.....	21
5.1.2 Implication des peptides liés aux molécules de classe I	24
5.1.3 Mécanismes.....	25
5.2 L'antigène Ly-49 murin versus molécules de classe I.....	28
6.COMPLEXE DES GÈNES NK	30
6.1 Complexe des gènes NK murin.....	30
6.2 Complexe des gènes NK humain.....	32
7.OBJECTIFS DU PROJET.....	33

MATÉRIEL ET MÉTHODES	37
1.HAMSTERS, SOURIS ET RATS	37
2.MILIEUX ET LIGNÉES CELLULAIRES	37
2.1 Milieux	37
2.2 Lignées cellulaires	38
3.ENRICHISSEMENT DES CELLULES NK MURINES	39
4.PRODUCTION DES CELLULES LAK	40
5.PURIFICATION DE L'ANTIGÈNE NK2 POUR L'IMMUNOBLOT	40
5.1 Préparation des extraits cellulaires	40
5.2 Préparation du gel 4LO3311-Sépharose.....	41
5.3 Chromatographie d'affinité.....	42
6.TECHNIQUE D'IMMUNOBLOT	43
7.RADIOIMMUNOPRÉCIPITATION	45
8.RADIOIMMUNOPRÉCIPITATION DE L'ANTIGÈNE NK2 PURIFIÉ PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ, AVEC LES SÉRUMS DE HAMSTERS IMMUNISÉS	46
9.PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX XÉNOGÉNIQUES	47
9.1 Protocoles d'immunisation.....	47
9.2 Technique de fusion.....	49
9.2.1 Préparation des cellules.....	49
9.2.2 Fusion.....	50
9.3 Criblage et clonage	51
9.4 Purification et conjugaison des AcM.....	51
9.5 Préparation des fragments F(ab') ₂	53
10.MARQUAGES DES CELLULES POUR ANALYSES DE CYTOMÉTRIE EN FLUX	54
10.1 Pour le phénotypage.....	54
10.2 Pour les expériences de compétition.....	55
11.EFFET DES AcM A5 ET F4 SUR LA LYSE DES CELLULES P815 PAR LES CELLULES LAK DE BALB/c	56
11.1 Préparation des cellules effectrices.....	56
11.2 Préparation des cellules cibles.	57
11.3 Test de cytotoxicité	57
RÉSULTATS	59
1.IMMUNISATIONS DES HAMSTERS	59
1.1 Justification du choix des protocoles d'immunisation.....	59
1.2 Vérification de la réponse des hamsters à l'antigène NK2	60
2.VÉRIFICATION DE LA PURETÉ DE LA PRÉPARATION D'ANTIGÈNE NK2 UTILISÉE POUR LES TESTS D'IMMUNOBLOT	64

3.FUSIONS ET CRIBLAGE DES SURNAGEANTS D'HÉTÉROHYBRIDOMES	67
4.RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 AVEC LES CELLULES NK DE SOURIS DE DIFFÉRENTES SOUCHES.....	77
5.RADIOIMMUNOPRÉCIPITATION DES LYSATS DE CELLULES NK DE SOURIS BALB/c ET C57BL/6.....	83
6.COMPÉTITION DES AcM A5, F4 ET 4LO3311 ENTRE EUX.....	86
6.1 Observations préliminaires	87
6.2 Compétition	90
7.RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 AVEC LES CELLULES NK DE LA SOURIS NZB	94
7.1 Analyse par cytométrie en flux.....	95
7.2 Radioimmunoprécipitation.....	95
8.INFLUENCE DES ANTIGÈNES DE CLASSE I DU CMH SUR L'EXPRESSION DE L'ANTIGÈNE NK2-.....	100
9.RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 AVEC LES CELLULES NK DE RAT.....	105
10.EFFET DES AcM A5 ET F4 ET DES FRAGMENTS F(ab') ₂ CORRESPONDANTS SUR LA CYTOTOXICITÉ DES CELLULES LAK DE BALB/c ENVERS LA CELLULE TUMORALE P815.....	108
DISCUSSION	113
1.PRODUCTION D'AcM XÉNOGÉNIQUES	113
2.SPÉCIFICITÉ ÉPITOPIQUE DES AcM A5 ET F4	114
3.RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 CHEZ LA SOURIS.....	116
3.1 Réactivité avec les cellules NK de différentes souches	116
3.2 Réactivité avec les cellules NK de NZB.....	118
4.PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES ÉPITOPES RECONNUS PAR LES AcM A5 ET F4.....	122
5.RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 CHEZ LE RAT.....	122
6.INFLUENCE DES ANTIGÈNES DE CLASSE I DU CMH.....	123
7.MODÈLE HYPOTHÉTIQUE D'ORGANISATION DES MOLÉCULES NK2.....	126
CONCLUSION.....	132
REMERCIEMENTS.....	135
BIBLIOGRAPHIE.....	136

LISTE DES TABLEAUX**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

TABLEAU I	Les récepteurs NK	34
------------------	--------------------------	-----------

MATÉRIEL ET MÉTHODES

TABLEAU II	Protocoles d'immunisation des hamsters	48
-------------------	---	-----------

RÉSULTATS

TABLEAU III	Résumé des fusions entre les cellules spléniques de hamsters immunisés avec les cellules NK ou LAK de souris BALB/c et des cellules myélomateuses murines	68
TABLEAU IV	Réactivité des cellules spléniques enrichies en cellules NK de souris congéniques et congéniques recombinantes, avec différents AcM anti-NK2	104

LISTE DES FIGURES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

FIGURE 1	Mécanismes d'activation et d'inhibition de la lyse des cellules cibles par les cellules NK	27
----------	--	----

RÉSULTATS

FIGURE 2	Exemples de tests de radioimmunoprécipitation et d'immunoblot pour détecter la présence d'anticorps anti-NK2 dans les sérum de hamsters immunisés	63
FIGURE 3	Vérification de la pureté de la préparation d'antigène NK2 utilisée pour les tests d'immunoblot	66
FIGURE 4	Criblage des surnageant d'hybridomes pour la détection d'anticorps anti-NK2	75
FIGURE 5	Réactivité des AcM anti-NK2 de hamster avec les cellules spléniques enrichies en cellules NK de différentes souches de souris en comparaison avec la réactivité de l'AcM 4LO3311	79
FIGURE 6	Radioimmunoprécipitation de lysats de cellules spléniques enrichies en cellules NK de souris BALB/c et C57BL/6, avec les AcM A5, F4 et 4LO3311	85
FIGURE 7	Mise au point des conditions expérimentales pour les tests de compétition entre les différents AcM anti-NK2	89
FIGURE 8	Compétition des AcM A5, F4 et 4LO3311 entre eux	92
FIGURE 9	Analyse cytofluorométrique de la réactivité des AcM A5 et F4 avec les cellules spléniques enrichies en cellules NK de la souris NZB	97
FIGURE 10	Radioimmunoprécipitation avec les AcM anti-NK2 d'un lysat de cellules spléniques enrichies en cellules NK de la souris NZB	99

FIGURE 11	Analyse de la modulation par le CMH de l'expression de l'antigène NK2	103
FIGURE 12	Réactivité des AcM A5 et F4 avec les cellules NK de rat	107
FIGURE 13	Effet des AcM A5 et F4 et des fragments F(ab') ₂ correspondants sur la cytotoxicité des cellules LAK de BALB/c envers la cellule tumorale P815, en comparaison avec l'AcM 4LO3311	111
DISCUSSION		
FIGURE 14	Modèle hypothétique d'organisation des molécules NK2	127

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcM :	anticorps monoclonal(aux)
BSA :	"bovine serum albumin" : albumine sérique bovine
cm :	centimètre
cM :	centiMorgan
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CRD :	"carbohydrate recognition domain"
ELISA :	"enzyme linked immunosorbent assay"
FITC :	fluoroisothiocyanate
g :	gramme
GM-CSF :	"granulocyte-macrophage colony stimulating factor"
Gy :	gray
h :	heure
HBSS :	"Hanks' balanced salt solution"
HLA :	"human leukocyte antigen"
IFN :	interféron
Ig :	immunoglobuline
IL :	interleukine
kDa :	kiloDalton
kpb :	kilo-paires de bases
LAK :	"lymphokine-activated killer"
LFA-1(-2) :	"lymphocyte function-associated antigen-1(-2)"
LGL :	"large granular lymphocyte"
LTC :	lymphocyte T cytotoxique

M :	molaire (ou mole par litre)
mCi :	milliCurie
mg :	microgramme
mg :	milligramme
ml :	microlitre
ml :	millilitre
mM :	millimolaire
M-CSF :	"monocyte-macrophage colony stimulating factor"
min :	minute
NCAM :	"neural cell homotypic adhesion molecule"
NK :	"natural killer"
nm :	nanomètre
PBS :	"phosphate buffer saline"
PEG :	polyéthylène glycol
PGS :	protéine G Sépharose
PMA :	"phorbol myristate acetate"
PMN :	polymorphonucléaire(s)
PMSF :	fluorure de phénylméthylsulfonyle
s :	seconde
SA-PE :	streptavidine-phycoérythrine
SCID :	"severe combined immunodeficiency"
SFB :	sérum foetal bovin
SDS :	"sodium dodecyl sulfate"
TCR :	récepteur des lymphocytes T
TNF :	"tumor necrosis factor"
U/ml :	unités par millilitre

SOMMAIRE

Les cellules natural killer (NK) sont des cellules lymphoïdes capables d'exercer une activité cytotoxique naturelle envers certaines cellules tumorales ou envers des cellules infectées par des pathogènes particuliers. Parmi les "récepteurs activateurs" d'intérêt des cellules NK se retrouve l'antigène NK2.1, qui est exprimé spécifiquement par les cellules NK de plusieurs souches de souris. Avant le début des travaux présentés dans ce mémoire, l'AcM 4LO3311 produit dans notre laboratoire était le seul AcM connu reconnaissant cet antigène. Puisque cet AcM avait été produit en réponse à une alloimmunisation, sa réactivité n'était potentiellement limitée qu'à certaines souches de souris.

Dans le but de mieux caractériser la distribution et les propriétés fonctionnelles de l'antigène NK2, deux hétérohybridomes hamster-souris sécrétant des AcM xénogéniques anti-NK2 ont été produits, soit les AcM A5 et F4. Ces AcM ont permis de confirmer l'hétérogénéité d'expression de l'antigène NK2, auparavant détectée par l'AcM 4LO3311 parmi différentes souches de souris. De façon importante, ils ont aussi été utiles dans la recherche de la présence d'une forme homologue de l'antigène NK2 chez une souche de souris dont les cellules NK ne réagissent pas avec l'AcM 4LO3311, soit la souris NZB. Chez cette souche de souris, l'AcM F4 a réagi avec une sous-population de cellules NK dans l'analyse par cytométrie en flux et a immunoprécipité un hétérodimère à partir d'un lysat de cellules spléniques enrichies en cellules NK. La présence d'une forme homologue de l'antigène

NK2 a aussi été recherchée chez le rat, mais aucune réactivité des AcM A5 et F4 avec les cellules NK de rat n'a été révélée.

Des expériences de compétition entre les trois AcM anti-NK2 chez la souris BALB/c ont permis de déterminer que les épitopes reconnus par les AcM A5 et F4 sont à la fois distincts entre eux et distincts de l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311. Toujours chez la souris BALB/c, l'épitope reconnu par l'AcM A5 possède le même potentiel activateur de la lyse que l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311, mais l'épitope reconnu par l'AcM F4 ne semble avoir aucun effet activateur ou inhibiteur. D'autre part, des travaux effectués avec l'AcM 4LO3311 nous avaient permis de formuler l'hypothèse que l'expression de l'antigène NK2 est influencée par les molécules de classe I de l'hôte. Des études analogues ont été entreprises avec les AcM A5 et F4 et seuls les résultats obtenus avec l'AcM F4 semblent confirmer cette hypothèse.

L'ensemble des résultats obtenus avec les nouveaux AcM anti-NK2 et avec l'AcM 4LO3311 seraient en accord avec l'existence d'une famille de molécules NK2 apparentées et nous autorisent à suggérer un modèle d'organisation de ces molécules. L'appartenance de ces molécules à des familles de récepteurs NK déjà connues est discutée. La production des deux nouveaux AcM anti-NK2 A5 et F4 ouvre la porte à de nouvelles études sur les molécules NK2.

INTRODUCTION

Une des principales propriétés des cellules NK est l'activité cytotoxique qu'elles exercent envers des cellules tumorales, des cellules infectées, et même des cellules normales hématopoïétiques. Les cellules NK ont été initialement considérées comme des "cellules nulles", parce qu'elles n'expriment pas les récepteurs d'antigènes classiques que sont les Ig de surface et les TCR. Les cellules NK faisant preuve toutefois d'une certaine spécificité quant aux cellules cibles qu'elles peuvent lyser, l'identification des molécules de surface impliquées dans la reconnaissance des cellules cibles et dans l'activation ou l'inhibition du cycle lytique mobilise aujourd'hui une grande partie des efforts de recherche. À ce jour, un assez grand nombre de "récepteurs NK" répartis en "récepteurs inhibiteurs" et "récepteurs activateurs" ont été identifiés sur les cellules NK de l'humain, de la souris et du rat. Une hypothèse courante voudrait que ce soit l'hétérogénéité dans la répartition de ces récepteurs qui confère aux cellules NK leur répertoire particulier de reconnaissance des cellules cibles. Des découvertes récentes identifiant des molécules de classe I du CMH comme les ligands naturels de certains récepteurs NK ont réanimé l'intérêt pour cette population particulière de cellules.

L'alloantigène NK2.1, identifié à l'origine par un antisérum NZB anti-BALB/c (Pollack et Emmons, 1982) est une des molécules exprimées spécifiquement à la surface des cellules NK murines. Notre laboratoire a été le premier à produire un AcM anti-NK2.1, l'AcM 4LO3311. Avant le début des travaux présentés dans ce mémoire, ce réactif était le seul AcM connu

spécifique de l'antigène NK2.1 (Lemieux *et al.*, 1991). Cet AcM nous a permis de découvrir que l'antigène NK2.1 était exprimé à des niveaux différents et sur des sous-populations de cellules NK de taille variable selon les différentes souches de souris (Morelli *et al.*, 1992). Il nous a de plus permis de déterminer que la molécule NK2.1 était une protéine dimérique fortement glycosylée, constituée de deux sous-unités de 65 kDa (Gosselin *et al.*, 1993) et codée par un gène situé sur le chromosome 6, en association avec des gènes codant pour d'autres récepteurs NK d'intérêt (Gosselin *et al.*, manuscrit soumis pour publication). De façon importante, plusieurs travaux avec l'AcM 4LO3311 nous ont permis de situer l'antigène NK2.1 parmi les "récepteurs d'activation" des cellules NK murines.

Étant donné que l'AcM 4LO3311 avait été produit en réponse à une alloimmunisation, ce réactif pouvait reconnaître soit un épitope particulier d'une molécule exprimée seulement par certaines souches de souris, soit un seul membre d'une famille de molécules homologues comme il en existe plusieurs parmi les récepteurs NK, soit enfin un épitope distinguant la forme allélique NK2.1 de la forme allélique NK2.2. Dès lors, le développement de nouveaux réactifs anti-NK2 s'imposait si on voulait progresser dans la caractérisation de cette molécule. Les objectifs généraux du présent travail étaient de produire des hétérohybridomes hamster-souris sécrétant des anticorps anti-NK2, de caractériser leur spécificité épitopique par rapport à l'AcM 4LO3311 et d'évaluer leur propriétés fonctionnelles. La production et l'analyse de deux AcM de hamster anti-NK2 sont rapportées dans ce mémoire.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES ET PHÉNOTYPIQUES DES CELLULES NK

Les cellules natural killer (NK) constituent une petite population de lymphocytes de grande taille possédant un noyau réniforme et des granules cytoplasmiques (McCoy et Chambers, 1991). Ces cellules dérivent de précurseurs de la moëlle osseuse et se retrouvent principalement dans le sang, dans la moëlle osseuse, et dans les tissus lymphoïdes périphériques, particulièrement la rate, mais aussi en nombre limité dans les ganglions lymphatiques et le thymus (Kiessling *et al.*, 1975 ; Trinchieri, 1989 ; Gosselin *et al.*, 1993). À l'origine, les cellules NK étaient surtout définies par leurs propriétés fonctionnelles. Elles sont par exemple impliquées dans le contrôle de la croissance de certains types de tumeurs primaires, dans la limitation de la dispersion des métastases *in vivo* et dans le rejet de greffe de moëlle osseuse allogénique (Warner et Dennert, 1982). Elles jouent aussi un rôle dans la régulation de l'hématopoïèse (Robertson et Ritz, 1990) et dans la résistance contre divers pathogènes, comme certains virus et bactéries intracellulaires (Trinchieri, 1989). Les cellules NK seraient aussi responsables du phénomène de résistance hybride (Kiessling *et al.*, 1977). La résistance hybride est un phénomène qui se produit lorsqu'une souris hybride hétérozygote (A x B)F₁ irradiée rejette une greffe de moëlle osseuse parentale homozygote (A ou B), phénomène qui va à l'encontre des lois classiques de la transplantation. L'existence d'antigènes codés par des gènes

récessifs et jouant un rôle dans les rejets de greffe (antigènes Hh-1 pour "hemopoietic histocompatibility antigens") pourrait expliquer la résistance hybride (Rembecki *et al.*, 1988). Ces gènes étant récessifs, les antigènes Hh ne sont exprimés que chez les souris homozygotes. Les cellules de souris homozygotes seront donc rejetées par un hôte hétérozygote.

Les cellules NK peuvent aussi être définies phénotypiquement. Il était déjà connu en 1975 qu'elles se distinguaient des cellules de la lignée des monocytes/macrophages, et des lymphocytes T et B matures (Kiessling *et al.*, 1975). En effet, les cellules NK ne possèdent aucun des récepteurs d'antigènes présents sur les lymphocytes B et T, soit les immunoglobulines de surface et le TCR (Trinchieri, 1989). Aucun réarrangement des gènes du TCR α , β , γ ou δ n'est observé dans les cellules NK et les ARNm correspondant à ces gènes n'y sont pas retrouvés (Tutt *et al.*, 1986 ; Biron *et al.*, 1987 ; Lanier *et al.*, 1989). Sauf quelques populations particulières, les cellules NK n'expriment pas le CD4 et le CD8. Les chaînes γ , δ , et ϵ du CD3 ne sont pas exprimées dans les cellules NK humaines (Lanier *et al.*, 1986), qui expriment par contre la chaîne ζ du CD3 (Anderson *et al.*, 1989), ainsi que le Fc γ RIIIA, ou CD16, un récepteur de faible affinité pour la portion Fc des IgG et qui serait le principal récepteur impliqué dans l'ADCC (Rochet *et al.*, 1992). Le Fc γ RIIIA est aussi présent sur les macrophages (Ravetch et Perussia, 1989). La molécule CD16 est aussi exprimée par les cellules NK murines (Perussia *et al.*, 1989).

L'IL-2 induit la prolifération des cellules NK *in vivo* et *in vitro* (Biron *et al.*, 1990 ; Phillips *et al.*, 1989). L'IL-12, d'abord nommé facteur de

stimulation des cellules NK (NKSF ; natural killer cell-stimulatory factor), stimule aussi la croissance et la prolifération des cellules NK (Kobayashi *et al.*, 1989). Le pouvoir cytotoxique des cellules NK est stimulé par l'IL-2, le NKSF ainsi que l'IFN- α/β (Perussia, 1991). L'IL-4 a des effets variables sur la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK, alors que l'IL-5, l'IL-7, l'IFN- γ et le TNF- α augmentent le potentiel cytotoxique des cellules NK (Perussia, 1991; Robertson et Ritz, 1990). Les cellules NK activées par l'IL-2 produisent de l'IFN- γ et du TNF- α suite à leur stimulation par des cellules tumorales (Chong *et al.*, 1989). Les cellules NK humaines activées sécrètent du GM-CSF, du M-CSF et de l'IL-3 (Cuturi *et al.*, 1989). Chez l'humain, l'IL-15, produite par les monocytes/macrophages, stimule la croissance et l'activité cytotoxique des cellules NK, l'ADCC, et la production d'IFN- γ , de TNF- α et de GM-CSF (Carson *et al.*, 1994).

2. ACTIVITÉ LYTIQUE DES CELLULES NK

2.1 Cytotoxicité cellulaire spontanée ou directe

C'est l'activité lytique naturelle qui est à l'origine des premières détections de l'existence des cellules NK. Elle se produit en absence d'anticorps, par les cellules NK au repos. Les cellules NK activées à l'IL-2 (cellules LAK) peuvent lyser un spectre de cellules cibles beaucoup plus large que les cellules NK non activées (Grimm *et al.*, 1982). La lignée de cellules prototype utilisée pour quantifier la lyse spontanée par les cellules NK

murines est la lignée YAC-1, qui provient d'un lymphome murin induit chez la souris A/Sn (H-2^a) par le virus de Moloney (Kiessling *et al.*, 1975).

Plusieurs autres lignées cellulaires ont été utilisées pour étudier le phénomène de lyse spontanée, comme la lignée YAC-6, qui est un sous-clone de la cellule YAC-1. De façon intéressante, cette lignée est résistante à la lyse par les cellules NK, mais des conjugués se forment entre la cellule cible et la cellule effectrice (Roder *et al.*, 1981). Une telle observation suggère que l'attachement de la cellule cible à la cellule effectrice n'est pas suffisant pour initier la lyse et que pour qu'elle se produise, un signal activateur doit être transmis. La lignée P815, un mastocytome provenant de la souris DBA/2 (H-2^d), est elle aussi résistante à la lyse spontanée. Toutefois, les cellules NK sont incapables de former des conjugués avec ces cellules (Roder et Kiessling, 1978). Certaines cellules cibles résistantes ne possèderaient donc ni les structures permettant l'attachement à la cellule effectrice ni la(les) structure(s) permettant l'activation de la lyse.

2.2 Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

L'ADCC est utilisée par plusieurs types cellulaires pour lyser une cellule cible pour laquelle ils n'ont pas de récepteur spécifique. Le contact entre les deux cellules se fait par l'intermédiaire d'un anticorps fixé sur une structure antigénique de la cellule cible par sa portion F(ab')₂, et sur la molécule CD16 de la cellule effectrice par sa portion Fc (Anasetti *et al.*, 1987). La plupart des études sur l'ADCC ont été effectuées avec des cellules

humaines. Il a été démontré que la stimulation du CD16 induit l'activation cellulaire par la mobilisation du calcium intracellulaire, l'hydrolyse des phosphoinositides membranaires et la production d'inositol tri-phosphate (Casatella *et al.*, 1989 ; Anasetti *et al.*, 1987). Le CD16 est associé de façon non covalente à des hétérodimères ou des homodimères des chaînes ζ et γ (Anderson *et al.*, 1989 ; Lanier *et al.*, 1989 ; Lanier *et al.*, 1991), chaînes qui se retrouvent aussi dans le complexe TCR/CD3 des lymphocytes T (Rochet *et al.*, 1992). La protéine kinase p56^{lck}, physiquement associée au Fc γ RIIIA via les chaînes ζ ou γ , serait responsable de la phosphorylation de ces sous-unités suite à l'engagement du CD16 (Vivier *et al.*, 1991 ; OShea *et al.*, 1992 ; Salcedo *et al.*, 1993). Le CD16 murin (Fc γ RIII α) est reconnu par l'AcM 2.4G2 (Perussia *et al.*, 1989). La stimulation du CD16 murin donne lieu à l'activation de la lyse puisque l'AcM 2.4G2 immobilisé induit l'exocytose granulaire des cellules NK (Morelli et Lemieux, 1993).

2.3 Lyse redirigée

La lyse redirigée (ou ADCC inversée) est une technique "artificielle" utilisée en recherche et qui n'a pas de correspondance *in vivo*. Les cellules cibles utilisées doivent être résistantes à la cellule effectrice. De cette manière, le contact entre les deux cellules se fait uniquement par l'intermédiaire d'un anticorps fixé sur une structure antigénique de la cellule effectrice par sa portion F(ab')₂, et sur la molécule CD16 de la cellule cible par sa portion Fc. Cette technique est ainsi utilisée pour étudier une fonction d'une protéine de surface de la cellule effectrice de façon isolée. Une

telle étude est normalement difficile à effectuer, puisque plusieurs molécules différentes sont probablement impliquées dans les phénomènes de cytotoxicité spontanée et qu'il est dès lors difficile de prouver la responsabilité unique d'une molécule par rapport à un phénomène observé. La lyse redirigée a d'abord été rapportée dans le cas de la lyse attribuable aux lymphocytes T cytotoxiques (LTC) : il avait été démontré qu'il est possible pour un LTC de lyser une cellule cible allogénique dont le CMH n'est pas compatible à son TCR, à l'aide d'un AcM dirigé contre ce TCR (Leo *et al.*, 1986). Depuis, de nombreuses études utilisant la technique de lyse redirigée ont été rapportées, dont plusieurs impliquant les cellules NK.

2.4 Mécanismes lytiques communs

Postérieurement à la liaison d'une cellule NK à une cellule cible, l'appareil de Golgi périnucléaire et les microtubules s'alignent en direction du site d'attachement, ce qui permet d'y acheminer les granules cytoplasmiques (Carpén *et al.*, 1983 ; Kupfer *et al.*, 1983 et 1984). S'ensuit alors la dégranulation des cellules NK par exocytose et la libération des facteurs solubles cytotoxiques (Carpén *et al.*, 1982), soit la perforine ("pore-forming protein" ou cytolysine) et des sérine estérases (ou "granzymes") (Joag *et al.*, 1989). Les molécules de perforine s'insèrent dans la membrane de la cellule cible sous forme de monomères et elles se polymérisent subséquentement pour former des pores transmembranaires qui entraînent la lyse de la cellule cible par choc osmotique (Joag *et al.*, 1989). Un même mécanisme s'applique pour l'activité lytique des lymphocytes T cytotoxiques

(Joag *et al.*, 1989). Récemment, il a été démontré que des souris "knock out" déficientes en perforine possèdent une activité cytotoxique NK très diminuée envers différents types de cellules cibles (Kägi *et al.*, 1994).

Un autre mécanisme de lyse semble pouvoir s'appliquer dans le cas des cellules NK, soit l'action de facteurs solubles qui causent la lyse par la fragmentation de l'ADN des cellules cibles (Duke *et al.*, 1986). Le TNF- α libéré par les cellules NK (Joag *et al.*, 1989), agirait en activant une endonucléase de la cellule cible, qui dégrade l'ADN en fragments d'environ 200 paires de bases (Dealtry *et al.*, 1987). Les NKCF "NK cell cytotoxic factors" sont d'autres facteurs solubles qui induisent la fragmentation de l'ADN de cellules cibles, bien qu'ils ne possèdent pas eux-même d'activité endonucléasique (Duke *et al.*, 1986). Plus récemment, une protéine de 32 kDa, la fragmentine, a été purifiée à partir des granules de cellules NK de rat. Cette protéine, qui ferait partie de la famille des granzymes, induit la fragmentation de l'ADN et l'apoptose des cellules cibles YAC-1 (Shi *et al.*, 1992). La présence de la perforine est essentielle à son activité (Shi *et al.*, 1992).

3. MÉCANISMES DE RECONNAISSANCE ET DE RÉGULATION DE LA LYSE

Cinq étapes ont été proposées pour décrire le mécanisme de cytotoxicité spontanée exercée par les cellules NK: (1) attachement de la cellule NK avec la cellule cible, (2) stabilisation des conjugués cellule cible-cellule effectrice,

(3) activation de la cellule effectrice, (4) choc lytique léthal, (5) mort de la cellule cible et recyclage de la cellule effectrice (Storkus et Dawson, 1991).

Les molécules accessoires ou d'adhésion jouent un rôle important dans le mécanisme de cytotoxicité. Les cellules NK murines possèdent un plus fort niveau d'expression de la β_2 -intégrine LFA-1 (CD11a/CD18) que les autres lymphocytes de la rate (Nishimura et Itoh, 1988). Chez l'humain, les patients qui possèdent une déficience au niveau de l'expression du CD18 et n'expriment pas de β_2 -intégrines (dont le LFA-1) ont des cellules NK qui ne possèdent pas d'activité cytotoxique envers certaines cellules cibles (Kohl *et al.*, 1984). Les β_2 -intégrines Mac-1 (CD11b/CD18) et p150/95 (CD11c/CD18) des cellules NK humaines ne semblent pas jouer un rôle important dans la lyse (Timonen *et al.*, 1988), au contraire des molécules CD2 (LFA-2) et CD56 (une des isoformes du NCAM) humaines, qui semblent importantes pour le mécanisme de cytotoxicité (Storkus et Dawson, 1991).

L'identification des structures des cellules cibles reconnues par les cellules NK est tout juste amorcée et la grande majorité des structures restent à identifier. Il a été suggéré que les ligands soient des molécules glycosylées. En effet, plusieurs molécules fonctionnelles des cellules NK identifiées à ce jour présentent des homologies avec les lectines de type C, famille de molécules qui lient des résidus glucidiques par des segments de leur portion extracellulaire appelés CRD, pour "carbohydrate-recognition domain", de façon spécifique et dépendante du calcium (Drickamer, 1988). Il a d'ailleurs été démontré que des sucres exogènes modulent la capacité cytolytique des cellules NK (McCoy et Chambers, 1991). D'autres études n'ont

pas réussi à démontrer l'influence de glycolipides ou des sucres N-liés aux glycoprotéines dans la reconnaissance de la cellule cible K562 par les cellules NK humaines : cette reconnaissance dépendrait plutôt de déterminants liés à des protéines (Voshol *et al.*, 1993). La possibilité de liaison de certaines molécules de la famille des lectines de type C à une structure peptidique n'est donc pas exclue, surtout que le CD23 et possiblement quelques sélectines, qui font partie de cette famille, ont la capacité d'effectuer les deux types d'interactions (Conrad, 1990 ; Pochon *et al.*, 1992).

Bien que très peu de ligands des cellules NK soient connus sur les cellules cibles, plusieurs molécules fonctionnelles dans l'activation ou l'inhibition de la lyse ont été découvertes sur les cellules NK. Le NK-TR est une protéine récemment identifiée sur les cellules NK humaines et hautement conservée entre les espèces. Elle jouerait un rôle important dans la reconnaissance des cellule cibles et dans la transduction de signaux et serait essentielle pour l'activité cytotoxique de type NK (Chambers *et al.*, 1994). Le NK-TR est une protéine transmembranaire de type II (extrémité COOH extracellulaire) de 150 kDa, dont le gène est retrouvé en une seule copie sur le chromosome 9 de la souris et le chromosome 3 de l'humain (Anderson *et al.*, 1993 ; Young *et al.*, 1993). Notre attention se portera toutefois essentiellement sur les molécules fonctionnelles des cellules NK murines.

4. MOLÉCULES FONCTIONNELLES DES CELLULES NK MURINES

4.1 NKR-P1

L'antigène NKR-P1 a d'abord été identifié chez le rat par l'AcM 3.2.3 (Chambers *et al.*, 1989). Le gène codant pour le NKR-P1 a été cloné et séquencé. La séquence en acides aminés déduite révèle une glycoprotéine transmembranaire de type II de 60 kDa, formée de deux sous-unités de 30 kDa (Chambers *et al.*, 1989 ; Giorda *et al.*, 1990). Des sérines sont retrouvées dans la portion intracellulaire, ce qui suggère un rôle du NKR-P1 dans la signalisation intracellulaire, puisque ces résidus sont des sites potentiels de phosphorylation (Giorda *et al.*, 1990). De plus, la stimulation du NKR-P1 induit l'hydrolyse des phosphoinositides membranaires et l'induction du flux calcique (Ryan *et al.*, 1991). Par ailleurs, la stimulation du NKR-P1 par l'AcM 3.2.3 induit la lyse redirigée de cellules cibles résistantes par les cellules NK et A-LAK, et la libération du contenu des granules cytotoxiques (Chambers *et al.*, 1989). Ces trois derniers faits suggèrent que le NKR-P1 de rat est un antigène d'activation.

Le domaine extracellulaire du NKR-P1 de rat possède des similarités avec les protéines de la superfamille des lectines de type C (Giorda *et al.*, 1990). En effet, plusieurs monosaccharides ont été identifiés comme ligands du NKR-P1. Il s'agit du β -N-acétyl-D-galactosamine, du β -N-acétyl-D-glucosamine, de l' α -L-fucose, du β -D-galactose et de l' α -D-mannose (Bezouska *et al.*, 1994a). Certaines séquences oligosaccharidiques

appartenant aux familles des gangliosides et des glycosaminoglycanes seraient aussi des ligands à haute affinité pour le NKR-P1 de rat (Bezouska *et al.*, 1994b). Ces derniers ont été retrouvés à la surface de cellules tumorales sensibles aux cellules NK et sont absents ou présents en très faible quantité sur les cellules résistantes (Bezouska *et al.*, 1994b). La spécificité du NKR-P1 ou des différents isotypes du NKR-P1 pour plusieurs oligosaccharides différents est une caractéristique partagée avec d'autres molécules de la famille des lectines (Bezouska *et al.*, 1994b).

Les gènes de la forme murine du NKR-P1 ont été clonés subséquentement, à partir d'une banque d'ADNc de cellules A-LAK de souris, et à l'aide d'une sonde fabriquée à partir du gène NKR-P1 de rat ; ils seraient situés sur le chromosome 6 murin (Giorda et Trucco 1991 ; Yokoyama *et al.*, 1991). Au moins trois gènes reliés, mais distincts, sont coexprimés dans les cellules A-LAK murines: *NKR-P1A*, *NKR-P1B* et *NKR-P1C* (Yokoyama et Seaman, 1993). L'analyse des séquences d'acides aminés déduites indiquent que les protéines correspondantes possèdent toutes une forte homologie avec la forme du NKR-P1 du rat et des sites potentiels de phosphorylation sur leur portion cytoplasmique (Giorda et Trucco 1991). Elles seraient toutes des protéines dimériques transmembranaires de type II possédant des motifs homologues aux CRD des lectines de type C (Giorda et Trucco, 1991).

Giorda *et al.* (1992) ont étudié, par une analyse de type Northern des ARN de cellules A-LAK de différentes souches de souris et des ADNc des gènes de la famille du NKR-P1, la distribution génétique des membres de cette famille. D'après ces résultats, la plus forte expression des gènes NKR-

P1 est observée pour les cellules A-LAK des souches NZB/BIN, C57BL/6, C57BL/10 et CE, alors qu'une expression faible ou nulle est notée dans le cas des cellules A-LAK des souches AKR, SJL, BALB/c, 129, DBA/1, DBA/2, C58, LP et CBA. Les trois gènes du NKR-P1 identifiés par cette équipe sembleraient donc co-régulés : tous les gènes sont exprimés, ou bien aucun n'est exprimé.

4.2 NK1.1

L'antigène NK1.1 a été le premier marqueur des cellules NK murines à être identifié. Le premier réactif anti-NK1.1 qui a été produit était un antisérum capable d'éliminer l'activité NK de certaines souches de souris en présence du complément (Glimcher *et al.*, 1977). Un alloanticorps monoclonal détectant spécifiquement l'antigène NK1.1, l'AcM PK136, a par la suite été produit (Koo et Peppard, 1984). L'alloantigène NK1.1 est exprimé sur la presque totalité des cellules NK de la souris C57BL/6, et sur certaines populations de lymphocytes T (Ryan *et al.*, 1992), et il présente du polymorphisme allélique : il est exprimé chez les souris C57BL/6, CE, C58, Ma/My, NZB SJL et ST, mais pas chez les souris BALB/c, A, AKR, CBA, C3H, DBA/1, DBA/2 et 129 (Koo et Peppard, 1984).

Il a été rapporté par Karlhofer et Yokoyama (1991) que l'AcM PK136 entier augmentait la lyse de cellules cibles Fc γ R⁺ par les cellules NK ou LAK de C57BL/6, mais n'affectait pas celle de cellules cibles Fc γ R⁻, résultats suggérant un rôle activateur de l'antigène NK1.1 via un mécanisme

conforme à la lyse redirigée. L'effet activateur de l'antigène NK1.1 dépendant de la présence d'une portion Fc intacte de l'AcM PK136, rapporté par Garni-Wagner *et al.* (1993), corrobore ces résultats.

L'antigène NK1.1 possédant la même capacité d'activation par lyse redirigée que l'antigène NKR-P1 de rat (Chambers *et al.*, 1989), et le gène codant pour le NK1.1 ayant été localisé sur le chromosome 6 murin (Sentman *et al.*, 1989b), plusieurs équipes avaient suggéré qu'il était en fait le produit d'un des gènes de la famille du NKR-P1. En effet, l'insertion d'un des ADNc des isoformes murines du NKR-P1 dans un système d'expression baculovirus a donné lieu à l'expression d'une protéine portant l'épitope reconnu par l'AcM PK136 et immunoprécipitée par l'AcM PK136 ; le NK1.1 est en fait le produit du gène *NKR-P1C* (Ryan *et al.*, 1992). Bien qu'il ait été initialement considéré que les souches NK1.1⁻ expriment une forme allélique du NK1.1, aucune forme allélique n'a encore été identifiée à ce jour, et Giorda *et al.* (1992) ont démontré de plus que les souches NK1.1⁻ expriment de très bas niveaux de transcripts des gènes de la famille du NKR-P1. L'antigène NK1.1 est une protéine transmembranaire formée de deux sous-unités glycosylées de 39 kDa reliées par des ponts disulfures et possédant un domaine extracellulaire homologue aux lectines de type C (Ryan *et al.*, 1992).

4.3 LGL-1

L'antigène LGL-1 (pour large granular lymphocyte) est reconnu par un AcM de rat, le 4D11, qui semble dirigé contre un déterminant non-

allélique spécifique aux cellules possédant une activité NK (Mason *et al.*, 1988). Le LGL-1 est exprimé chez les souches de souris C57BL/6, BALB/c, AKR/N, DBA/2N, C3H/HeJ et SJL/J et semble non-polymorphique (Mason *et al.*, 1988). L'antigène LGL-1 est une protéine de 87 kDa formée de deux sous-unités de 40 kDa N-glycosylées fortement reliées par des ponts disulfures (Mason *et al.*, 1988 et 1994a). Le clonage du gène codant pour le LGL-1 et la séquence en acides aminés prédite ont permis de déterminer que cet antigène fait partie de la famille de molécules Ly-49 (Mason *et al.*, 1994b), dont nous discuterons en détails à la section 5.2.

L'antigène LGL-1 définit deux populations égales de cellules NK ayant des propriétés fonctionnelles distinctes chez la souris C57BL/6 (Mason *et al.*, 1990). La population NK1.1⁺/LGL-1⁻ contient la majorité des cellules possédant l'activité LAK et générant les cellules LAK, alors que la population NK1.1⁺/LGL-1⁺ ne génère pas d'activité LAK. Les deux sous-populations de cellules fraîches ont toutefois la capacité d'exercer la lyse spontanée de la cellule YAC-1 et l'ADCC (Mason *et al.*, 1990). L'antigène LGL-1 serait aussi impliqué dans la lyse redirigée de cellules cibles FcγR⁺ par les cellules NK de C57BL/6 activées (Mason *et al.* 1994a).

4.4 5E6

La protéine reconnue par l'AcM murin SW5E6 est exprimée sur 50 % des cellules NK et LAK de la souris C57BL/6 et chez la souris NZB (Sentman *et al.*, 1989a). Il s'agit d'un homodimère de 110 kDa formé de deux sous-

unités de 54 kDa reliées par des ponts disulfures (Sentman *et al.*, 1989a). Le gène codant pour la molécule 5E6 a été cloné par Stoneman *et al.* (1995) ; la séquence en acides aminés prédite définit une glycoprotéine transmembranaire de type II dont la portion extracellulaire possède une homologie avec les protéines de la superfamille des lectines de type C.

Les populations de cellules 5E6⁺ et 5E6⁻ diffèrent dans leur habilité à rejeter des greffes de moëlle osseuse. La population 5E6⁺ joue un rôle dans le rejet des greffes portant les antigènes Hh-1^d, mais pas dans celui des greffes portant les antigènes Hh-1^b, indiquant ainsi que la reconnaissance des différents antigènes Hh-1 serait effectuée par différentes sous-populations de cellules NK (Sentman *et al.*, 1989a). D'ailleurs, il été suggéré par la suite que la molécule 5E6 soit le récepteur pour l'antigène Hh-1^d (Stoneman *et al.*, 1993). L'antigène 5E6 ne serait toutefois pas impliqué dans la reconnaissance des structures cibles des cellules tumorales, puisque la capacité des cellules NK à lyser des cellules cibles H-2^d ou H-2^b est indépendante de l'expression de la molécule 5E6 (Sentman *et al.*, 1991).

4.5 2B4

L'antigène 2B4 est reconnu par l'AcM murin SW2B4. Il s'agit d'une molécule de surface monomérique de 66 kDa exprimée sur toutes les cellules NK1.1⁺ fraîches et activées de la souris C57BL/6 et sur une certaine population de lymphocytes T stimulés par l'IL-2 (Garni-Wagner *et al.*, 1993). Le gène codant pour l'antigène 2B4 a été cloné et la séquence en acides

aminés déduite définit une protéine transmembranaire possédant 8 sites de N-glycosylation (Mathew *et al.*, 1993). Contrairement à plusieurs autres antigènes fonctionnels des cellules NK murines, l'antigène 2B4 possède des homologies de séquence avec les protéines de la superfamille des Ig.

Trois transcrits d'ARNm ont été isolés à partir des cellules A-LAK des souches de souris C57BL/6, BALB/c, CBA, DBA/2 et NZB, bien que l'épitope reconnu par l'AcM 2B4 ne soit pas exprimé chez les souches de souris BALB/c et DBA/2 (Mathew *et al.*, 1993). Ceci suggère que seulement certaines souches de souris possèdent le déterminant allotypique reconnu par l'AcM 2B4. Les trois ARNm représenteraient des produits d'épissage alternatif, mais il n'est pas connu si ces tous ces ARNm sont traduits *in vivo* (Mathew *et al.*, 1993). Bien que la distribution génétique de l'antigène 2B4 ressemble à celle de l'antigène NK1.1, dont le gène est situé sur le chromosome 6, le gène codant pour l'antigène 2B4 est situé sur le chromosome 1 (Garni-Wagner *et al.*, 1993). Il semblerait de plus, d'après les analyses génomiques de l'ADNc par Southern blot chez différentes souches de souris, qu'une famille de gènes 2B4 reliés existe (Mathew *et al.*, 1993).

L'AcM SW2B4 augmente l'activité cytotoxique non restreinte par le CMH des lymphocytes T. Bien que les cellules NK fraîches expriment l'antigène 2B4, l'AcM SW2B4 n'augmente l'activité cytotoxique des cellules NK que lorsqu'elles sont activées à l'IL-2 (Garni-Wagner *et al.*, 1993). L'AcM anti-2B4 stimule la sécrétion d'IFN- γ et l'exocytose granulaire des cellules NK activées à l'IL-2 (Garni-Wagner *et al.*, 1993).

4.6 NK2.1

L'alloantigène NK2.1 a d'abord été mis en évidence par un sérum NZB anti-BALB/c (Pollack et Emmons, 1982). Subséquemment, un AcM reconnaissant les cellules NK murines, l'AcM 4LO3311, a été produit dans notre laboratoire suite à l'immunisation d'une souris 129 avec les cellules NK de la souris C57BL/6 (Lemieux *et al.*, 1991). Le sérum NZB anti-BALB/c et l'AcM 4LO3311 présentant la même distribution de réactivité avec plusieurs lignées de souris (Lemieux *et al.*, 1991) et les deux réactifs immunoprécipitant la même molécule (Gosselin *et al.*, 1993), l'AcM 4LO3311 reconnaît donc spécifiquement l'antigène NK2.1. Le NK2.1 est une protéine transmembranaire dimérique de 130 kDa fortement glycosylée, formée de deux sous-unités de 65 kDa reliées par des ponts disulfures ; après déglycosylation, les deux sous-unités ont un poids moléculaire apparent de 32 kDa (Gosselin *et al.*, 1993).

L'antigène NK2.1 caractérise une sous-population de cellules NK retrouvée chez les souris A/J, AKR/J, BALB/cAnN, C57BL/6, C57BL/10, C3H/He, CBA/J, DBA/1J, DBA/2J, LP/J et ST/bJ, mais pas chez certaines autres souches, notamment CE, Ma/MY et NZB (Lemieux *et al.*, 1991). Entre toutes les souches de souris qui expriment l'antigène NK2.1, il existe des variations notables dans le nombre de cellules NK réagissant avec l'AcM 4LO3311 et dans la densité d'expression de l'antigène NK2.1 à la surface cellulaire (Morelli *et al.*, 1992).

Plusieurs observations nous permettent de suggérer fortement que l'antigène NK2.1 est un antigène d'activation. En effet, pour une même lignée de souris, l'activité lytique des cellules LAK NK2.1⁺ est 5 fois supérieure à celle des cellules LAK NK2.1⁻ (Morelli et Lemieux, 1993). De plus, l'AcM 4LO3311 fixé dans des puits de culture provoque l'exocytose granulaire des cellules LAK (Morelli et Lemieux, 1993), et sous forme soluble, il a la capacité d'augmenter la lyse de cellules cibles sensibles par les cellules NK non activées (Morelli et Lemieux, 1993). L'activation des cellules NK via l'antigène NK2.1 et l'AcM 4LO3311 n'est pas une conséquence du phénomène de lyse redirigée, puisque l'augmentation de la lyse est similaire pour les cibles FcR⁺ et FcR⁻, et que les fragments Fab et F(ab')₂ sont aussi efficaces que l'AcM 4LO3311 entier (Morelli et Lemieux, 1993).

5. IMPLICATIONS DES ANTIGÈNES DE CLASSE I DU CMH

5.1 Cellules NK versus molécules de classe I

Les antigènes de classe I sont des antigènes multialléliques codés par le CMH. Ils sont formés d'une sous-unité de 44 kDa, ancrée dans la membrane cytoplasmique, associée de façon non covalente à une chaîne de 11 kDa (non codée par un gène du CMH), la β 2-microglobuline, et à un peptide (Krangel *et al.*, 1979 ; Bjorkman *et al.*, 1987).

5.1.1 Corrélation entre l'expression des molécules de classe I et la susceptibilité à la lyse

Une cellule NK peut lyser spontanément une cellule cible qui possède des molécules du CMH non-identiques à celles qu'elle exprime elle-même, ou une cellule cible qui ne possède pas de molécules du CMH du tout (Ljunggren et Kärre, 1990). C'est pourquoi la reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK est définie comme étant "non restreinte par le CMH", par opposition aux lymphocytes T qui peuvent uniquement lyser des cellules qui expriment le même CMH qu'eux. Les cellules NK peuvent ainsi lyser des cellules qui échappent à la surveillance exercée par les lymphocytes T. De plus, on a longtemps considéré que les cellules NK lysaient leurs cellules cibles via des mécanismes "non-spécifiques" de reconnaissance. Plusieurs observations suggèrent toutefois que des mécanismes spécifiques sont impliqués et, entre autres, que les antigènes du CMH de classe I sont reliés à l'état de sensibilité ou de résistance des cellules cibles vis-à-vis les cellules NK. Certaines molécules de surface des cellules NK interagissent même directement avec des antigènes de classe I du CMH, tout comme les lymphocytes T le font via le TCR. La reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK, bien qu'étant "non restreinte par le CMH", seraient donc quand même "influencée par le CMH".

Selon "l'hypothèse de l'absence du soi", une des fonctions des cellules NK serait de surveiller les tissus pour l'expression des molécules de classe I et d'éliminer les cellules qui démontrent une expression anormale (Ljunggren et Kärre, 1990). D'ailleurs, des niveaux élevés de l'oncogène

cellulaire *c-myc* dans des mélanomes humains ont été associés à une déficience en molécules de classe I et à un phénotype de sensibilité aux cellules NK (Versteeg *et al.*, 1988). Dans le même ordre d'idée, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'existence d'une corrélation inverse entre l'expression des molécules de classe I sur les cellules cibles et la susceptibilité à la lyse par les cellules NK (Kärre *et al.*, 1986 ; Storkus *et al.*, 1987 ; Storkus *et al.*, 1989a). Ainsi, un grand nombre de lignées de cellules mutantes qui n'expriment pas de molécules du CMH de classe I sont plus susceptibles à la lyse que la lignée parentale (Piontek *et al.*, 1985 ; Kärre *et al.*, 1986). Chez des cellules humaines sensibles aux cellules NK, déficientes pour la traduction de la β_2 -microglobuline et donc pour l'expression des molécules de classe I, la résistance est conférée par la transfection du gène fonctionnel de la β_2 -microglobuline (Quillet *et al.*, 1988). Dans certains cas observés chez l'humain, la résistance aux cellules NK ne serait toutefois conférée que par la transfection de seulement certains allèles des molécules de classe I (Storkus *et al.*, 1989b). Chez la souris, la restauration de l'expression des molécules D^b et K^b du CMH à la surface de thymomes murins rend ces cellules auparavant sensibles, résistantes à la lyse par les cellules NK de souris CBA/J (Sturmhöfel et Hämmerling, 1990). De même, la transfection du gène de H-2K^b dans les cellules YAC-1 réduit leur susceptibilité aux cellules NK murines (Carlow *et al.*, 1990). Des études *in vivo* montrent que des cellules de moëlle osseuse de souris transgéniques qui n'expriment pas de molécules de CMH de classe I à cause d'une déficience en β_2 -microglobuline sont rejetées par les cellules NK des souris de type sauvage lorsqu'elles y sont transférées (Bix *et al.*, 1991).

Plusieurs études soutiennent l'hypothèse que des récepteurs fonctionnels des cellules NK lient spécifiquement des molécules du CMH de classe I. Des travaux effectués chez l'humain ont démontré que la molécule dimérique Kp43 (CD94) exprimée sur les cellules NK (Aramburu *et al.*, 1990 et 1991), est un récepteur pour au moins un allèle HLA-B et la liaison du Kp43 à l'allèle HLA-B7 transmet un signal inhibiteur de la lyse à la cellule NK (Moretta *et al.*, 1994). D'autres molécules inhibitrices liant des molécules de classe I sont regroupées dans la famille de molécules p58. Certaines des ces protéines de 55 à 58 kDa sont reconnues par les AcM GL183 et EB6 et sont exprimées spécifiquement par des sous-populations de cellules NK humaines (Moretta *et al.*, 1992). Elles fonctionneraient comme des récepteurs pour différents allèles HLA-C "protecteurs" (les allèles Cw3 et Cw4) et transmettraient un signal inhibiteur de la lyse (Moretta *et al.*, 1993). La structure des molécules p58 ne ressemble pas à celle des molécules du groupe des lectines de type C, dont plusieurs récepteurs NK activateurs murins font partie, ce qui pourrait expliquer leur fonction différente (Wagtmann *et al.*, 1994). Le NKB1 est une protéine monomérique de 70 kDa exprimée sur des sous-populations de cellules NK humaines, qui serait responsable de la liaison de certains allèles HLA-B, soit HLA-B*5101 et HLA-B*5801 (Litwin *et al.*, 1994). Plusieurs études suggèrent que plus d'un récepteur d'allèles HLA différents pourraient être exprimés simultanément sur une même cellule NK.

Le Kp43, les molécules p58 et le NKB1, par leur action inhibitrice, seraient impliquées dans le mécanisme de protection des cellules autologues en reconnaissant différentes molécules de classe I du soi. Un mécanisme de

protection des cellules normales contre la lyse par leur propres cellules NK existe effectivement, comme le démontre l'habilité de certains anticorps anti-HLA de classe I à permettre la lyse de cellules cibles autologues normales (Ciccone *et al.*, 1994).

5.1.2 Implication des peptides liés aux molécules de classe I

Les antigènes de classe I peuvent lier de façon constitutive un peptide spécifique à un allèle donné dans la niche à peptide des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Falk *et al.*, 1991). Des études ont démontré que la résistance conférée par les molécules HLA de classe I à certaines cellules cibles est directement reliée aux domaines $\alpha 1/\alpha 2$ (Storkus *et al.*, 1989b ; Sentman *et al.*, 1994). En effet, une mutation d'un seul acide aminé dans le domaine $\alpha 1$ de HLA-A2, un allèle "non protecteur", confère un phénotype de résistance aux cellules NK humaines (Storkus *et al.*, 1991). Plusieurs études ont par la suite démontré la modulation de la sensibilité aux cellules NK par les peptides étrangers liés aux molécules de classe I des cellules cibles (Storkus *et al.*, 1992 ; Chadwick *et al.*, 1992). Il a aussi été suggéré que l'altération du peptide endogène lié aux molécules de classe I par l'infection virale de la cellule pouvait annuler la résistance aux cellules NK (Kaufman *et al.*, 1992). Une autre démonstration de l'importance du peptide dans la résistance est l'étude de Colonna *et al.* (1993) sur deux groupes de clones de cellules NK humaines. Ces auteurs ont démontré que la lyse par le premier groupe de cellules NK était inhibée par les produits des allèles HLA-C possédant les mutations Asn-77 et Lys-88 (soit HLA-Cw4, -Cw5, et -Cw6), tandis que la lyse par le

deuxième groupe de cellules NK était inhibée par les produits des allèles HLA-C possédant les mutations Ser-77 et Asn-80 (HLA-Cw1, -Cw7 et -Cw13). Ces positions, par analogie à d'autres antigènes de classe I, correspondraient au site de liaison du peptide sur HLA-C. Donc, autant les peptides liés aux molécules du CMH (ou le changement de conformation induit par la présence du peptide) que les molécules elles-même pourraient influencer la résistance à la lyse. Ainsi, les molécules de classe I pourraient présenter des peptides aux cellules NK, comme elles le font avec les lymphocytes T.

5.1.3 Mécanismes

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet inhibiteur des molécules de classe I du CMH : (1) les molécules de classe I du CMH masquent les ligands des molécules d'activation des cellules NK sur les cellules cibles (Storkus et Dawson, 1991) (2) les cellules NK possèdent des récepteurs d'activation, mais aussi des récepteurs d'inhibition qui reconnaissent spécifiquement un antigène du CMH, ou une conformation particulière de l'antigène du CMH due au peptide lié, ou encore l'association peptide-antigène du CMH (Ljunggren et Kärre, 1990).

Bien que le premier modèle ait longtemps été favorisé, la grande majorité des travaux récents supporte le deuxième modèle. Celui-ci requiert non seulement l'existence d'un éventail de récepteurs d'activation, mais aussi d'une grande variété de récepteurs d'inhibition pour reconnaître les

différents antigènes polymorphiques du CMH, ce qui semble d'ailleurs être le cas. La présence de molécules avec des fonctions antagonistes exprimées sur une même cellule peut paraître problématique. Tel ne serait toutefois pas le cas, car il semble qu'un signal inhibiteur transmis par les molécules de classe I domine les signaux activateurs, peu importe leur nature, ADCC, lyse redirigée ou lyse spontanée (Karlhofer *et al.*, 1992 ; Correa *et al.*, 1994). Une représentation schématique de différents mécanismes de lyse spontanée, inspirée du deuxième modèle, est illustrée à la figure 1. Cette représentation pourrait s'appliquer autant dans le cas des cellules NK murines qu'humaines.

Dans le premier modèle, qui reste quand même possible, il n'y a pas de transduction de signaux reliés à l'inhibition, seulement un empêchement de l'activation de la lyse. Dans le deuxième modèle, la nature exacte du signal inhibiteur n'est pas encore connue. Il a d'abord été rapporté que l'inhibition ne s'exerce pas par l'abolition de la transduction du signal activateur (Kaufman *et al.*, 1993). D'un autre côté, les travaux rapportant l'effet inhibiteur de la liaison d'une molécule de classe I avec des récepteurs des cellules NK humaines (Kp43) et des cellules NK murines (Ly-49), n'ont pas encore démontré l'existence d'une transduction de signaux biochimiques reliés à cette inhibition. La mise en évidence récente de l'association des molécules inhibitrices p58 avec la chaîne ζ du CD3, la chaîne γ du Fc ϵ RI et la kinase p56^{lck}, qui sont aussi associées au CD16 dans les cellules NK humaines, laisse supposer qu'une transduction de signaux inhibiteurs serait possible via ces récepteurs (Bottino *et al.*, 1994). Toutefois, la

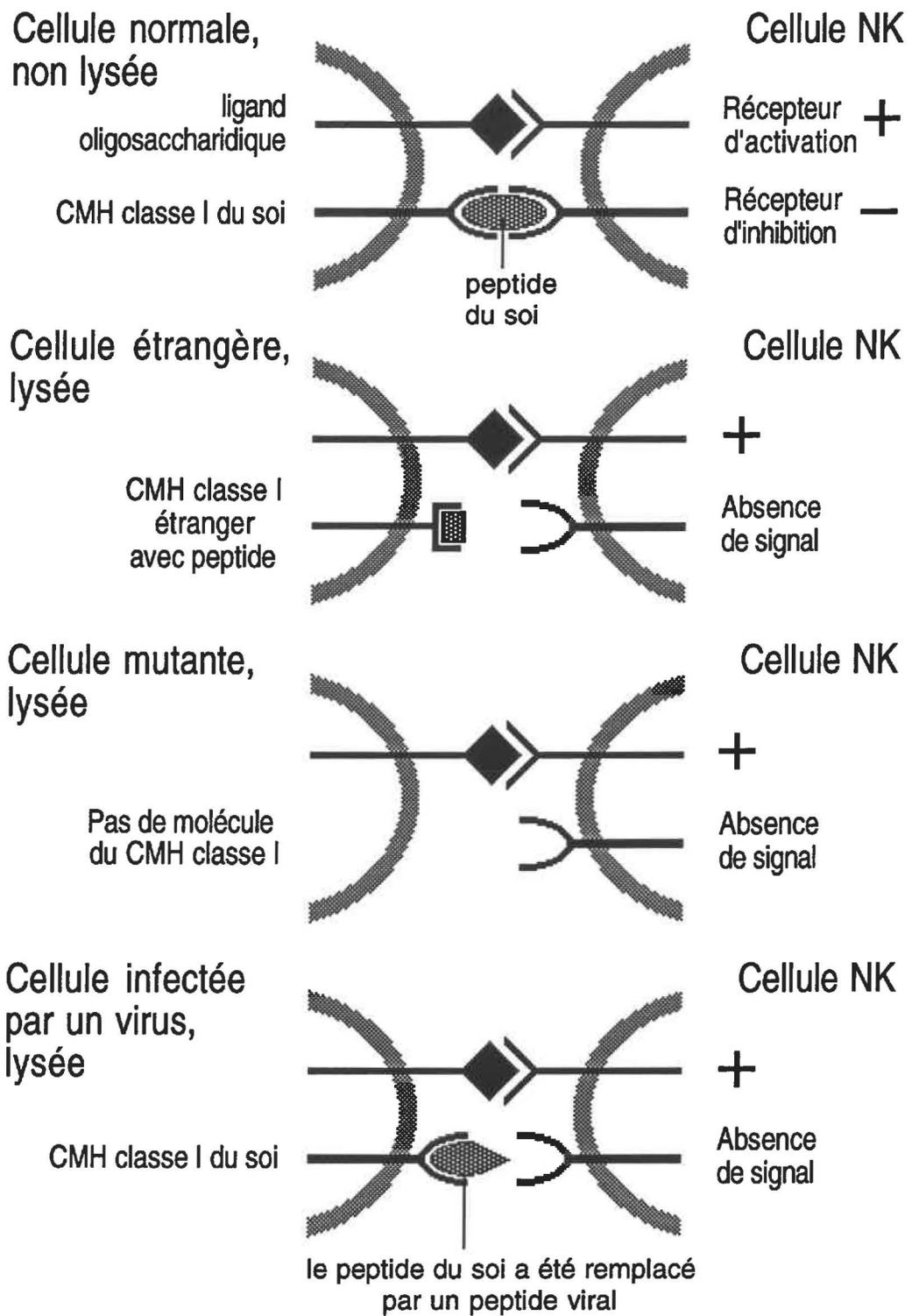


FIGURE 1 Mécanismes d'activation et d'inhibition de la lyse des cellules cibles par les cellules NK
D'après Kärre, 1995

phosphorylation de la chaîne ζ n'a pas pu être démontrée lors de la stimulation des molécules p58.

Certaines observations indiquent que le mécanisme de reconnaissance des cellules cibles dépendant de l'absence ou de la présence des antigènes de classe I et illustré à la figure 1, n'est pas le seul mécanisme de reconnaissance utilisé par les cellules NK dans la lyse spontanée. Premièrement, certaines cellules qui n'expriment pas d'antigènes de classe I ne sont pas lysées (Zijlstra *et al.*, 1992). Deuxièmement, des études chez la souris (Nishimura *et al.*, 1988) et chez l'humain (Leiden *et al.*, 1989) ont démontré une absence de corrélation entre l'expression des molécules de classe I et la susceptibilité à la lyse. Troisièmement, les cellules NK peuvent lyser des cellules infectées par des virus qui possèdent une expression des molécules de classe I inaltérée (Quanhui *et al.*, 1992).

5.2 L'antigène Ly-49 murin versus molécules de classe I

L'antigène Ly-49A est reconnu par l'AcM murin A1 (Nagasawa *et al.*, 1987), les AcM de rat YE1/32 et YE1/48 (Chan et Takei, 1986) et par l'AcM murin JR9-318 (Roland et Cazenave, 1992). Le Ly-49A est une glycoprotéine dimérique transmembranaire de type II de 85 kDa, formée de deux sous-unités de 44 kDa reliées par des ponts disulfures, et qui possède un domaine extracellulaire semblable aux lectines de type C (Chan et Takei, 1988 et 1989 ; Yokoyama *et al.*, 1989). Le gène codant pour le Ly-49A fait partie d'une famille de gènes très homologues située sur le chromosome 6, dans la même

région que les gènes *NKR-P1* (Chan et Takei, 1989 ; Yokoyama *et al.*, 1989 et 1990 ; Yokoyama et Seaman, 1993). Cette famille comprend, en plus du gène *Ly-49A*, les gènes *Ly-49B*, *Ly-49C*, *Ly-49D*, *Ly-49E*, *Ly-49F*, *Ly-49G.1*, *Ly-49G.2*, *Ly-49G.3* et *Ly-49H* (Wong *et al.*, 1991 ; Smith *et al.*, 1994 ; Brennan *et al.*, 1994). Des travaux récents ont démontré que le produit du gène *Ly-49C* serait en fait l'antigène 5E6 (Brennan *et al.*, 1994).

Le *Ly-49A* est exprimé sur 20% des cellules NK1.1⁺ de la souris C57BL/6 (H-2^b), ainsi que sur une sous-population de lymphocytes T (Yokoyama *et al.*, 1990). Dans une expérience fort intéressante, il a été démontré que la transfection et l'expression du gène de H-2D^d dans une cellule cible H-2^b sensible la rend résistante aux cellules *Ly-49A*⁺, alors que la transfection et l'expression des gènes H-2K^d ou H-2L^d n'a aucun effet (Karlhofer *et al.*, 1992). La résistance conférée est renversée par un AcM dirigé contre les domaines $\alpha 1/\alpha 2$ de H-2D^d et par l'AcM anti-*Ly-49A*, suggérant ainsi qu'un signal inhibiteur est induit par la liaison du *Ly-49A* aux domaines $\alpha 1/\alpha 2$ de H-2D^d sur la cible (Karlhofer *et al.*, 1992). La liaison du *Ly-49A* avec les molécules H-2D^d et D^k purifiées a été directement démontrée (Kane, 1994) et Daniels *et al.* (1994a) ont rapporté que la liaison de la molécule *Ly-49A* à la molécule H-2D^d s'effectuait via les domaines $\alpha 1/\alpha 2$. Cette dernière équipe a de plus démontré que l'interaction du *Ly-49A* avec la molécule H-2D^d dépend de structures glucidiques (Daniels *et al.*, 1994b), ce qui concorde avec l'homologie du *Ly-49A* avec les protéines de la superfamille des lectines de type C. Par ailleurs, le fait que la liaison semble se produire via les domaines $\alpha 1/\alpha 2$ suggère que l'affinité du *Ly-49A* pour une molécule de classe I pourrait être modulée par les peptides qui y sont liés.

Cette hypothèse est aussi supportée par les travaux de Smith *et al.* (1994) et Karlhofer *et al.* (1994), qui proposent que le Ly-49 interagit avec les domaines des molécules de classe I impliqués dans les interactions avec les peptides et le TCR.

Alors que le Ly-49A lie les lignées cellulaires transfectées H-2^d et H-2^k, le Ly-49C lie les lignées H-2^d, H-2^k, H-2^b et H-2^s : les molécules Ly-49A et Ly-49C possèderaient donc des répertoires différents en ce qui a trait à la liaison de molécules de classe I (Brennan *et al.*, 1994). Un effet inhibiteur de la molécule H-2K^d indépendant de la présence du Ly-49A a été démontré, suggérant ainsi l'existence d'autres récepteurs d'inhibition pouvant lier cette molécule (Roth *et al.*, 1994). Ces récepteurs pourraient être d'autres membres de la famille Ly-49, par exemple les produits des gènes *Ly-49B* et *Ly-49D* à *Ly-49G* pour lesquels il n'existe pas encore de réactifs sérologiques, ou encore ils pourraient faire partie d'une autre famille de molécules. Le répertoire de reconnaissance des molécules de classe I des différentes sous-populations de cellules NK serait ainsi grandement diversifié.

6. COMPLEXE DES GÈNES NK

6.1 Complexe des gènes NK murin

Le complexe de gènes NK murin comprend les gènes *Ly-49* (Yokoyama *et al.*, 1990) et les gènes *NKR-P1* (Yokoyama *et al.*, 1991 ; Giorda et Trucco, 1991). Ces deux familles de gènes sont séparées par 0,4 à 0,5 cM sur la

portion distale du chromosome 6, soit par moins de 500 kpb (Yokoyama et Seaman, 1993). Toutes les protéines connues codées par les gènes des familles du NKR-P1 et du Ly-49 sont des protéines transmembranaires de type II glycosylées, possédant des homologies de séquence avec les protéines de la superfamille des lectines de type C et des sites potentiels de phosphorylation dans leur portion intracellulaire (Giorda et Trucco, 1991 ; Yokoyama *et al.*, 1991 ; Giorda *et al.*, 1990 ; Yokoyama *et al.*, 1989). Les gènes *NKR-P1* et *Ly-49* semblent toutefois représenter des familles de molécules différentes, vu l'absence d'une homologie significative au niveau des gènes et une homologie de seulement 25% au niveau de la chaîne d'acides aminés (Yokoyama *et al.*, 1991). Ceci est en accord avec leurs fonctions antagonistes (activation vs inhibition), et avec le fait que les domaines cytoplasmiques du NKR-P1 et du Ly-49 ne présentent pratiquement pas d'homologie (Yokoyama *et al.*, 1991).

Le gène de la forme murine de l'antigène d'activation CD69 se retrouve aussi en association avec le complexe des gènes NK (Ziegler *et al.*, 1994). Le CD69 est une autre protéine transmembranaire de type II, membre de la superfamille des lectines de type C (Ziegler *et al.*, 1994) et formée de chaînes glycosylées de 35 à 40 kDa (Testi *et al.*, 1994). L'expression du gène codant pour le CD69 peut être induite dans les cellules NK et dans la presque totalité des cellules dérivant des lignées hématopoïétiques (Ziegler *et al.*, 1994). Un autre locus présent dans le complexe des gènes NK est le *Cmv-1* qui contribue à conférer un phénotype de résistance face à une infection létale par le cytomégalovirus murin (mCMV) (Scalzo *et al.*, 1992). Les souris résistantes possèdent l'allèle *Cmv-1^l*, alors que les souris sensibles possèdent

l'allèle *Cmv-1^h*. La résistance a été attribuée à l'activité des cellules NK. *Cmv-1* pourrait donc coder pour deux formes alléliques d'une molécule de surface des cellules NK ; la forme allélique présente chez les souris résistantes serait impliquée dans la reconnaissance des cellules infectées par le mCMV (Scalzo *et al.*, 1992).

6.2 Complexe des gènes NK humain

Un complexe NK homologue à celui du chromosome 6 murin existerait sur la portion analogue du chromosome 12p de l'humain. Le gène codant pour l'homologue humain du NKR-P1, le hNKR-P1A, se trouve dans cette région. La séquence déduite du hNKR-P1A possède 46 % d'homologie avec les séquences des NKR-P1 murin et de rat (Lanier *et al.*, 1994), et définit une glycoprotéine transmembranaire de type II possédant des caractéristiques de la famille des lectines de type C et exprimée par une sous-population de cellules NK et de lymphocytes T (Lanier *et al.*, 1994).

La famille de gènes NKG2 est aussi située sur le chromosome 12 humain (Yabe *et al.*, 1993). Ces gènes codent pour des glycoprotéines transmembranaires de type II encore non caractérisées et présentant des homologies avec les lectines animales de type C. Jusqu'à présent, au moins quatre gènes NKG2 ont été identifiés : *NKG2-A*, *NKG2-B*, *NKG2-C* et *NKG2-D* (Houchins *et al.*, 1991). Les polypeptides NKG2-A et NKG2-B semblent provenir de l'épissage alternatif d'un même gène (Houchins *et al.*, 1991). Le gène codant pour la forme humaine du CD69 est aussi situé dans le

complexe des gènes NK, près des gènes NKG2 (Ziegler *et al.*, 1994). Le CD69 humain est un dimère formé de chaînes de 28 ou 32 kDa reliées par des ponts disulfures (Testi *et al.*, 1994). L'existence de gènes humains homologues aux gènes du Ly-49 murins n'a toujours pas été rapportée. Le tableau I récapitule les récepteurs NK de l'humain, du rat et de la souris dont il a été question dans cette revue bibliographique.

7. OBJECTIFS DU PROJET

L'antigène NK2.1 est une molécule importante dans le fonctionnement des cellules NK murines. Nous possédons déjà l'avantage de détenir le seul réactif connu dirigé contre cette molécule, soit l'AcM 4LO3311. Toutefois, la caractérisation plus poussée des fonctions et de la distribution de l'antigène NK2.1 bénéficierait grandement de la production de nouveaux AcM détectant des épitopes différents de celui détecté par l'AcM 4LO3311. En effet, les études que nous pouvons effectuer avec l'AcM 4LO3311 sont limitées par le fait qu'il reconnaît vraisemblablement un alloantigène, puisqu'il a été produit par une immunisation chez des individus génétiquement différents, mais appartenant à la même espèce (AcM allogénique). L'utilisation d'un animal d'une autre espèce pour l'immunisation avec l'antigène NK2.1 offrirait l'avantage de rendre la molécule injectée beaucoup plus immunogène. Les AcM xénogéniques découlant de cette immunisation auront idéalement une réactivité beaucoup plus étendue par rapport aux lignées de souris et pourraient détecter des épitopes ayant des fonctions différentes de celui reconnu par l'AcM 4LO3311. Ils permettront de

TABLEAU I. LES RÉCEPTEURS NK

Molécule	Espèce	PM (kDa)	Expression	Effet sur la cytotoxicité	Ligand
Récepteurs codés par des gènes du complexe NK					
NKR-P1	rat souris	60 NR 30 R	NK	activation	oligo-saccharides
NK1.1 (NKR-P1C)	souris	80 NR 38 R	NK sp de T	activation	?
NKR-P1A	humain	85 NR 44 R	sp de NK et T	?	?
Ly-49A	souris	85 NR 44 R	sp de NK sp de T	inhibition	H-2D ^d , D ^k
5E6 (Ly-49C)	souris	110 NR 54 R	sp de NK	?	CMH classe I ou Hh-1
LGL-1	souris	87 NR 40 R	sp de NK	?	?
NK2.1	souris	130 NR 65 R	sp de NK	activation	?
NKG2	humain	?	NK	?	?
CD69	souris humain	70 NR 28, 32 R	cellules hémato- poïétiques	activation	?
Autres récepteurs NK					
2B4	souris	66	NK, T activées	activation	?
p58	humain	55 ou 58	sp de NK	inhibition	HLA-C
NKB1	humain	70, 50 D	sp de NK	inhibition	HLA-B
Kp43(CD94)	humain	70 NR 43 R	NK, sp de T	inhibition	HLA-B
NK-TR	humain	150	NK	activation	?
FcγRIIIA (CD16)	humain souris	50-80	NK, PMN, macrophages	activation	IgG

NR, non-réduit; R, réduit; D, déglycosylé; sp, sous-population; PM, poids moléculaire

D'après Yokoyama, 1995a.

rechercher l'éventuelle forme allélique NK2.2 ou bien des molécules homologues NK2 (dans le cas de l'existence d'une famille de molécules analogue à celles du Ly-49 et du NKR-P1), s'ils sont dirigés contre des déterminants antigéniques invariables sur les différentes formes de la molécule NK2.

Des immunisations entre espèces différentes ont déjà été utilisées pour la production d'AcM dirigés contre les cellules NK. Plusieurs équipes se sont tournées vers la production d'hétérohybridomes chez le hamster, parfois à la suite de certaines difficultés à produire des AcM anti-souris chez le rat. En effet, le hamster offre l'avantage d'être phylogénétiquement plus éloigné de la souris que le rat (Sanchez-Madrid *et al.*, 1983). Plusieurs fusions efficaces entre les cellules spléniques de hamsters et des lignées cellulaires de souris ont ainsi été rapportées (Bright *et al.*, 1990 ; Metlay *et al.*, 1990 ; Pullen *et al.*, 1988 ; Goodman et Lefrançois, 1989 ; Maxfield *et al.*, 1989 ; Kubo *et al.*, 1989 ; Leo *et al.*, 1987 ; Schreiber *et al.*, 1985 ; Sheehan *et al.*, 1989). Des lignées cellulaires de souris sont utilisées comme partenaires de fusion, puisqu'il n'existe pas encore de lignées cellulaires de hamster qui ont fait leurs preuves comme partenaire de fusion. Le hamster Armenian est la souche la plus souvent choisie, car de plus grandes efficacités de fusion ont été obtenues avec cette souche qu'avec le hamster Syrian (Sanchez-Madrid *et al.*, 1983). Plus récemment, des AcM réagissant avec les cellules NK murines ont été produits chez le hamster, mais ils ne sont vraisemblablement pas dirigés contre l'antigène NK2 (Linnemeyer *et al.*, 1994).

Le premier objectif de ce projet était donc de produire des AcM xénogéniques, par la fusion des cellules spléniques de hamsters Armenian immunisés contre l'antigène NK2.1 avec une lignée de cellules myélomateuses murines. Il s'agissait ensuite de vérifier si l'hétérogénéité d'expression de l'antigène NK2 chez différentes souches de souris serait révélée par les nouveaux AcM anti-NK2 de la même manière qu'avec l'AcM 4LO3311. Il était aussi question de comparer la spécificité épitopique des AcM xénogéniques par rapport à celle de l'AcM 4LO3311, puis de rechercher une forme homologue de l'antigène NK2.1 chez les souches de souris dont les cellules NK ne réagissent pas avec l'AcM 4LO3311. Finalement, il importait de déterminer les propriétés fonctionnelles des épitopes reconnus par les nouveaux AcM anti-NK2. Ces cinq objectifs ont donc constitué le fondement du travail présenté dans ce mémoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. HAMSTERS, SOURIS ET RATS

Les hamsters Armenian femelles ont été obtenus du Dr George Yerganian de Cytogen Research and Development Inc., West Roxbury, MA, USA. Les hamsters ont été immunisés à partir de l'âge de 2 mois. Les souris BALB/cAnN, C57BL/6N, DBA/2N et C3H/HeN des deux sexes ont été achetées chez Charles River Canada Inc. (St-Constant, Québec, Canada). Les souris C57BL/10SnJ, NZB/BINJ et LP/J, les souris congéniques B10.BR/SgSnJ, B10.D2/nSnJ et B10.A/SgSnJ, et les souris congéniques recombinantes B10.A(2R)/SgSnJ et B10.A(5R)/SgSnJ, provenaient toutes de chez The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Les souris ont été utilisées à partir de l'âge de 7 semaines. Les rats Fisher F344/NTP ont été obtenus de Taconic Farms, Germantown, NY, USA et ont été utilisés lorsqu'âgés de 15 semaines.

2. MILIEUX ET LIGNÉES CELLULAIRES

2.1 Milieux

Toutes les lignées cellulaires ainsi que les hétérohybridomes ont été cultivés à 37°C dans un incubateur dont l'atmosphère contenait 5 % de CO₂. Le milieu de culture était du RPMI 1640 contenant 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate, 0,25 µg/ml de fongizone, 20 mM d'acide N'-2-hydroxyéthyl-

pipérazine-N'-2-éthanesulfonique (HEPES) (tous de Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) et 50 µg/ml de gentamycine (Schering Canada). Ce milieu RPMI complet a été enrichi par du sérum foetal bovin (SFB ; Immunocorp Sciences, Montréal, Québec, Canada ou Gibco BRL) à une concentration de 10 % pour les lignées continues et les cultures primaires et de 10 % à 15 % pour les hétérohybridomes. Dans certains cas, la gentamycine a été remplacée par 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco BRL).

2.2 Lignées cellulaires

Les lignées de cellules P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, NIH/3T3 et P815 ont toutes été obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC ; Rockville, MD, USA). La cellule P815 est un mastocytome provenant de la souris DBA/2. Les cellules des lignées SP2/0-Ag14 et P3X63Ag8.653 ont été utilisées comme partenaires de fusion avec les cellules spléniques de hamster immunisé. Ce sont des myélomes provenant de la souris BALB/c qui ne sécrètent et ne synthétisent aucune chaîne des immunoglobulines et sont sensibles à l'hypoxanthine, aminoptérine, thymidine (HAT). Des cellules NIH/3T3 irradiées à 60 Gy (6 000 rads) ont été utilisées comme cellules nourricières pour les hybridomes. Ces cellules proviennent d'une lignée de cellules embryonnaires de la souris Swiss.

3. ENRICHISSEMENT DES CELLULES NK MURINES

Les cellules NK ont été enrichies à partir des cellules spléniques totales, selon la méthode décrite par Morelli *et al.* (1993). À cet effet, la rate a été prélevée, placée dans un volume minimal de HBSS (Gibco BRL) et triturée délicatement. Après lyse osmotique des érythrocytes, la suspension cellulaire a subi deux cycles de filtration sur une colonne de 0,6 à 3 g de laine de nylon (Robbins Scientific) selon le nombre de cellules utilisées. Les cellules non adhérentes à la laine de nylon ont ensuite été incubées pendant 30 min à 4°C avec un anticorps de rat anti-CD4 (clone MT4, fourni par Dr F.J. Dumont, Merck, Sharp and Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, USA), à un rapport de 75 µg d'anticorps pour 1×10^7 cellules et avec un anticorps de rat anti-CD8 (clone 53-6.72 de l'ATCC) à un rapport de 50 µg d'anticorps pour 1×10^7 cellules. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du HBSS, puis incubées 30 min à 4°C avec des billes magnétiques enrobées d'anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de rat (Dynabeads M-450 de Dynal Inc., Great Neck, NY, USA) à un rapport de 5 billes par cellule. Les cellules CD4⁺ et CD8⁺ ont été éliminées à l'aide d'un appareil magnétique (Dynal Inc., Great Neck, NY, USA). Les cellules non liées aux billes magnétiques ont été récoltées dans du HBSS, centrifugées et resuspendues dans le milieu et le volume requis pour l'usage auquel elles étaient destinées. De 2 à 4 % des cellules spléniques totales ont été récupérées à la fin de l'enrichissement, et la population contenait de 80 à 93 % de cellules NK. Les cellules polymorphonucléées constituent normalement le principal contaminant.

4. PRODUCTION DES CELLULES LAK

Les cellules NK enrichies selon la procédure décrite précédemment ont été resuspendues à la concentration de 1×10^6 cellules/ml dans du milieu RPMI complet contenant 10 % de SFB, 5×10^{-5} M de β -2-mercaptoéthanol (Sigma Chemical, St-Louis, Missouri, USA) et 250 U/ml d'IL-2 murine recombinante (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada). La culture a été poursuivie pendant 6 à 9 jours. Le surnageant de cellules non adhérentes a été récupéré et combiné avec les cellules adhérentes, qui ont été récoltées après incubation de 5 à 10 min à 37°C dans une solution de PBS (Gibco BRL) contenant 0,1 % d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA ; Sigma).

5. PURIFICATION DE L'ANTIGÈNE NK2 POUR L'IMMUNOBLOT

5.1 Préparation des extraits cellulaires

Les cellules LAK adhérentes et non-adhérentes de souris BALB/c, provenant de cultures primaires de 6 à 9 jours, ont été lavées 3 fois dans du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 60 min à 4°C dans le tampon de lyse (Tris.HCl 50 mM pH 8,0 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), NaCl 150 mM, Nonidet P-40 0,5 %) contenant 1 % de BSA et 1mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) (tous de Sigma), à raison de 100 μ l de tampon pour 1×10^7 cellules. Les noyaux cellulaires ont été éliminés

par une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants ont été conservés à -70°C.

5.2 Préparation du gel 4LO3311-Sépharose

Le gel était composée de l'AcM 4LO3311 anti-NK2.1 (Lemieux *et al.*, 1991) couplé à des billes de Sépharose 4B activées au bromure de cyanogène (Pharmacia, Ste-Anne-de-Bellevue, Qc). Le couplage a été effectué selon le protocole du fabricant. L'AcM 4LO3311 (6,1 mg) a été dialysé contre le tampon de couplage (NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), NaCl 0,5 M). La solution d'AcM 4LO3311 (6,0 mg dans 4,8 ml) a été ajoutée à 2 ml de gel gonflé (gel couplé) et 4,8 ml de tampon de couplage a été ajouté à un autre 2 ml de gel gonflé (gel non couplé). Les deux gels ont été incubés pour la nuit sous rotation à 4°C et ensuite centrifugés à 40 g pendant 1 min. L'absorbance à 280 nm des surnageants a été mesurée sur un appareil Spectronic 1201 (Milton Roy, Rochester, NY, USA), le surnageant du gel non couplé ayant servi de valeur de référence. La quantité d'AcM du surnageant du gel couplé (AcM non couplés) a été calculée ainsi : $A_{280} \div 1,34 = \text{concentration en mg/ml}$. Elle était de 91 µg, ce qui signifie une efficacité de couplage de 98 % et une concentration d'environ 3,3 mg d'AcM/ml de gel. Pour bloquer l'excès de groupes actifs du Sépharose 4B, les gels couplé et non couplé ont été incubés dans le tampon de couplage contenant 0,2 M d'éthanolamine (Sigma), selon les indications du fabricant. Les gels ont été entreposés à 4°C dans un tampon Tris.HCl 0,1 M pH 8,0, NaCl 0,14 M et azoture de sodium 0,025 % (NaN₃, Fisher Scientific).

5.3 Chromatographie d'affinité

Les lysats cellulaires provenant de six cultures de cellules LAK ont été décongelés et regroupés ensemble pour la chromatographie d'affinité. Le nombre correspondant de cellules a été estimé à 5 à 6 x 10⁸. Le volume de gel 4LO3311-Sépharose nécessaire à la purification de l'antigène a été calculé de façon à obtenir 50 µg d'AcM 4LO3311 pour 1 x 10⁷ cellules. Un volume de gel non couplé équivalent au double du volume de gel 4LO3311-Sépharose a été utilisé pour clarifier les lysats cellulaires, par une incubation de 2 h 30 min sous agitation à 4°C. Le surnageant qui contient toutes les protéines non liées au gel non couplé a ensuite été transféré dans un tube contenant le gel 4LO3311-Sépharose avec lequel il a été incubé pour la nuit à 4°C sous agitation. Le surnageant de l'incubation a été conservé pour une deuxième incubation avec le gel 4LO3311-Sépharose.

L'élution de l'antigène NK2 a été effectuée à 4°C. Le gel 4LO3311-Sépharose a été lavé avec 15 ml de tampon de lavage Tris.HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 140 mM, NaN₃ 0,025 %, Triton X-100 0,5 % (Sigma), puis avec cinq volumes de gel 4LO3311-Sépharose des tampons 1 et 2 (tampon 1 = Tris.HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M et Triton X-100 0,1 % ; tampon 2 = Na₂HPO₄ 50 mM (Fisher Scientific), NaH₂PO₄ 50 mM (Sigma) pH 6,3, NaCl 500 mM, Triton X-100 0,1 %). L'antigène a été élué avec le tampon glycine.HCl 50 mM (Bio-Rad) pH 2,5, NaCl 500 mM et Triton X-100 0,1 %, et récolté dans un tube contenant du tampon Tris.HCl 1 M pH 9,0, NaCl 0,5 M, Triton X-100 0,1 %, pour ajuster le pH (0,2 volume du tampon glycine.HCl). L'antigène a été concentré par centrifugation sur Centricon-30 (Amicon Canada Ltd.,

Oakville, Ontario, Canada) et la solution d'antigène a été congelée à -70°C , jusqu'à utilisation pour les tests d'immunoblot.

6. TECHNIQUE D'IMMUNOBLOT

La technique d'immunoblot a servi au criblage des surnageants d'hétérohybridomes hamster-souris pour la production d'AcM anti-NK2, et à la recherche d'anticorps anti-NK2 dans le sérum des hamsters immunisés. Toutes les étapes ont été effectuées à la température ambiante et toutes les solutions ont été préparées immédiatement avant leur utilisation. L'antigène NK2 purifié et concentré tel que décrit à la section 5 a été décongelé et dilué 1 : 100 dans une solution de PBS contenant 1 % de BSA (Sigma). Une membrane de nitrocellulose de 0,45 microns (Bio-Rad) a été placée dans un appareil Bio-Dot de 96 puits (Bio-Rad), et un volume de 0,2 μl de la dilution 1 : 100 d'antigène NK2 a été déposé dans tous les puits qui recevront un échantillon. Comme contrôle positif, 0,1 μg d'IgG de hamster anti-TCR $\alpha\beta$ a été déposé dans un puits directement sur la membrane, au lieu de l'antigène NK2 purifié. Lorsque la solution d'antigène et le contrôle de hamster étaient bien séchés, les sites non occupés ont été bloqués pendant 1 h en ajoutant dans chaque puits 200 μl d'une solution de PBS contenant 5 % de caséine (Sigma). Après avoir enlevé la solution de caséine, les surnageants de culture d'hybridomes (125 à 150 μl) ou les sérums de hamster à tester (50 μl d'une dilution 1 : 10) ont été déposés dans les puits. À la même étape, comme contrôle positif, l'AcM 4LO3311 (0,3 μg d'AcM, soit 150 μl d'une solution à 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a été ajouté dans un puits. Comme contrôles

négatifs, 150 µl de surnageant de culture du clone PK136, produisant une IgG2a de souris anti-NK1.1 et 150 µl de surnageant de culture des cellules P3X63Ag8.653 (partenaires de fusion) ont été déposés dans deux autres puits. Tous les échantillons ont été incubés sur la membrane pendant 1 h à la température ambiante. La membrane a ensuite été lavée six fois avec une solution de PBS-BSA 1 %, en déposant 200 µl par puits et en vidant les puits par inversion. La membrane a ensuite été enlevée de l'appareil et incubée pendant 1 h dans un pétri avec la solution de PBS-caséine 5 %. Pour révéler les Ig réagissant avec l'Ag NK2 et les IgG de hamster contrôles, la membrane a ensuite été incubée dans une solution de 0,5 µg/ml de protéine A couplée à la peroxidase (Sigma). La révélation a été réalisée par chimio-luminescence en incubant la membrane pendant 1 min avec les réactifs de détection pour immunobuvardages (Western blot) ECL (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England). La membrane a ensuite été séchée, emballée dans un plastique transparent et exposée pendant 1 min sur film Kodak XAR-2 (Picker International Canada, Ville St-Laurent, Québec). Le film a été développé dans l'appareil de développement automatique X-OMAT de Kodak.

7. RADIOIMMUNOPRÉCIPITATION

Les cellules NK enrichies fraîches ou les cellules LAK ont été lavées trois fois dans du PBS pH 7.2 et resuspendues dans 50 µl. Pour l'iodation, des enzymobeads (Bio-Rad) ont été ajoutées à raison de 50 µl pour 1×10^7 cellules, suivies de β -D-glucose-6-phosphate 1 % (Boehringer Mannheim) préparé immédiatement avant usage (25 µl pour 1×10^7 cellules) et d'iode-125 sous forme de Na^{125}I (ICN Radiomedicals, Irvine, California, USA) à raison de 1 mCi pour 1×10^7 cellules. L'iodation a été poursuivie pendant 40 min à température ambiante. La période d'incubation a été prolongée dans le cas où une iodation plus prononcée était requise. Les cellules ont ensuite été incubées avec 500 µl de tampon de lyse contenant du BSA et du PMSF (voir section 5.1) pour 1×10^7 cellules. Les noyaux cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. Le lysat contenant les protéines cellulaires radioactives a passé par trois cycles d'incubation d'une heure à 4°C, sous agitation, avec 100 µl de protéine G-Sépharose 4 Fast Flow (PGS, Pharmacia) pour 1×10^7 cellules. Le surnageant clarifié a alors été incubé avec l'AcM voulu (50 µg pour 1×10^7 cellules) ou avec 12 µl du sérum approprié pendant 1 h à 4°C, et par la suite avec la PGS pendant toute la nuit sous agitation à 4°C.

Le lendemain, le surnageant de l'incubation avec la PGS a été jeté. La PGS a été lavée quatre fois avec le tampon de lyse contenant 1 % de BSA et deux fois avec le tampon de lyse. Les antigènes immunoprécipités ont été élués de la PGS en faisant bouillir les échantillons pendant 5 min dans un tampon Tris.HCl 125 mM pH 6,8, glycérol 10 % et SDS 2 %, additionné de 5 %

de 5 % de β -2-mercaptoéthanol pour l'analyse en conditions réductrices. Les standards de poids moléculaires précolorés (Bio-Rad) ont aussi été bouillis dans les mêmes conditions. Les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 7,5 %, SDS 0,1 % et Tris 375 mM pH 8,8. La migration des protéines a été effectuée à 200 Volts. Le gel a été fixé dans du méthanol 50 %, séché et exposé à -70°C sur film Kodak XAR-2 (Picker International Canada) pendant 16 h ou plus.

8. RADIOIMMUNOPRÉCIPITATION DE L'ANTIGÈNE NK2 PURIFIÉ PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ, AVEC LES SÉRUMS DE HAMSTERS IMMUNISÉS

Les cellules NK de la souris BALB/c ont été enrichies tel que décrit à la section 3. L'iodation et la lyse des cellules ont été effectuées conformément à la technique décrite à la section 7. Le lysat cellulaire iodé a été clarifié par une incubation de 2 h avec un volume de gel non couplé (voir section 5.2) correspondant à deux fois le volume de gel 4LO3311-Sépharose nécessaire pour la chromatographie d'affinité, puis par une incubation de 2 h avec la PGS, à raison de 100 μl pour 1×10^7 cellules. Le surnageant clarifié a ensuite été incubé toute la nuit sous agitation à 4°C avec un volume de gel 4LO3311-Sépharose correspondant à 50 μg d'AcM pour 1×10^7 cellules.

Le lendemain, le gel 4LO3311-Sépharose a été centrifugé et le surnageant de l'incubation conservé pour l'analyse électrophorétique. Le gel 4LO3311-Sépharose a été lavé quatre fois avec le tampon de lyse contenant 1%

de BSA et deux fois avec le tampon de lyse. Une partie du gel 4LO3311-Sépharose avant élution a été conservé pour l'analyse électrophorétique. L'élution de l'antigène NK2 retenu sur le gel 4LO3311-Sépharose a été effectuée tel que décrit dans la section 5.3, mais le gel 4LO3311-Sépharose était contenu dans un tube plutôt que dans une colonne. Chaque tampon de lavage a été laissé en contact avec le gel pendant 2 min en agitant occasionnellement, puis le tube a été centrifugé et le surnageant jeté. Le tampon d'élution a été laissé 5 min avec agitations occasionnelles avant la centrifugation. Une deuxième élution avec le tampon glycine a été effectuée et les deux surnageants d'élution ont été combinés. Le gel 4LO3311-Sépharose après élution a été conservé pour l'analyse électrophorétique. La présence de l'antigène NK2 dans l'éluat a été vérifiée par immunoprécipitation avec l'AcM 4LO3311. L'éluat a été utilisé pour rechercher par immunoprécipitation la présence d'anticorps anti-NK2 dans les sérums de hamsters immunisés. L'immunoprécipitation et l'analyse électrophorétique ont été effectuées dans les conditions décrites à la section 7.

9. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX XÉNOGÉNIQUES

9.1 Protocoles d'immunisation

Les hamsters ont été immunisés par voie intra-péritonéale avec de 5 à 30×10^6 cellules dans du PBS (Tableau II). Quatre hamsters ont été

TABLEAU II. PROTOCOLES D'IMMUNISATION DES HAMSTERS

Fusion	Cellules injectées	Nombre de cellules (x 10 ⁶)	Injections
1	NK	5	1 : 9/12/93
		6	2 : 11/1/94
		20	3 : 4/4/94
2	NK	9	1 : 14/12/94
		7	2 : 12/1/94
		13	3 : 2/5/94
3	NK	5	1 : 9/12/93
		6	2 : 11/1/94
		11	3 : 24/2/94
		12	4 : 19/4/94
		16	5 : 6/6/94
4	NK	11	1 : 24/2/94
		12	2 : 19/4/94
		15	3 : 3/6/94
		15	4 : 28/6/94
		11	5 : 25/7/94
5	LAK	20	1 : 24/5/94
		20	2 : 13/6/94
		20	3 : 8/7/94
		30	4 : 22/8/94
6	LAK	30	1 : 8/7/94
		14	2 : 1/8/94
		30	3 : 22/8/94
		26	4 : 4/11/94

immunisés avec des cellules NK murines fraîches, enrichies à partir de cellules spléniques de souris BALB/c (fusions #1 à #4). Deux hamsters ont été immunisés avec des cellules NK enrichies de souris BALB/c cultivées en présence d'IL-2 pendant 4 à 7 jours (cellules LAK ; fusions #5 et #6). Tous les hamsters ont reçu un minimum de deux injections avant le prélèvement des sérums, qui ont été testés pour la présence de l'antigène NK2 par la technique d'immunoblot (voir section 6) et par radioimmunoprécipitation d'un lysat de cellules NK enrichies de souris BALB/c (voir section 7). Certains sérums de hamster ont été testés par radioimmunoprécipitation de l'antigène NK2 purifié par chromatographie d'affinité (voir section 8). Les animaux qui avaient bien répondu ont été laissés au repos pour au moins quatre semaines. Leurs cellules spléniques ont été utilisées pour la fusion avec des cellules myéломateuses trois jours après qu'ils aient reçu une dernière injection de cellules NK enrichies ou de cellules LAK de BALB/c. Les animaux chez qui la réactivité avec l'antigène NK2 était trop faible ont été réinjectés à deux ou trois reprises avant que leurs cellules spléniques soient utilisées.

9.2 Technique de fusion

9.2.1 Préparation des cellules

Toutes les manipulations ont été effectuées dans du RPMI complet. Le hamster a été anesthésié et sacrifié par dislocation cervicale. La rate a été prélevée stérilement et triturée délicatement afin de limiter la libération des

cellules non lymphoïdes, en particulier les fibroblastes. La suspension cellulaire a été filtrée sur une gaze et centrifugée. Le culot a été resuspendu dans du RPMI et les cellules comptées. Les cellules myélomateuses (P3X63Ag8.653 ou SP2/0-Ag14) ont aussi été centrifugées, resuspendues dans du RPMI et comptées. Le volume de suspension de cellules utilisé pour la fusion a été calculé selon le rapport cellules spléniques : cellules myélomateuses décidé, soit de 10 : 1 ou 5 : 1.

9.2.2 Fusion

La température de tous les milieux et réactifs a été maintenue à 37°C. Les cellules spléniques et les cellules myélomateuses ont été combinées dans un tube (Sarstedt) et centrifugées à 300 g pendant 5 min. Le culot de cellules a été resuspendu délicatement et le tube placé dans un bain à 37°C. Un ml de polyéthylène glycol 1450 40 % (PEG ; Sigma) a été ajouté goutte à goutte pendant 1 min en agitant avec la pointe de la pipette. L'agitation a été poursuivie pendant 1 min. Deux ml de RPMI ont été ajoutés sur une période de 2 min en agitant, suivis de 7 ml de RPMI, ajoutés de la même manière sur une période de 2 à 3 min. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 300 g pendant 5 min. Le surnageant a été aspiré et 10 ml de RPMI additionné de 10 ou 15 % de SFB et de 1 % d'hypoxanthine-aminoptérine-thymidine (HAT ; Sigma) ont été ajoutés d'un seul coup au culot de cellules sans repipeter. Les cellules ont été réparties dans des plateaux de culture de 96 puits à fond plat (Nunc) à des concentrations variant de 7 à 50 x 10⁴ cellules par puits. Dans certains cas, des cellules nourricières NIH/3T3 irradiées à 60 Gy (6 000 rads)

ont été réparties dans les plateaux à une concentration de 1×10^4 cellules par puits, la journée précédant la fusion ou quelques jours après la fusion.

9.3 Criblage et clonage

La présence d'anticorps anti-NK2 dans les surnageants d'hybridomes a été recherchée par la technique d'immunoblot (voir section 6), entre les jours 11 et 30 post-fusion, soit lorsque les hybridomes avaient atteint de 30 à 80 % de croissance. Les hybridomes dont les surnageants ont réagi positivement ont été clonés deux à trois fois par la technique de dilution limite, à une concentration variant de 1 à 10 cellules par puits selon la vigueur apparente des hybridomes.

9.4 Purification et conjugaison des AcM

Des surnageants de culture des hétérohybridomes anti-NK2 ont été produits à partir d'un clone ayant passé par trois cycles de clonage par dilution limite. Les hybridomes ont été cultivés dans du milieu RPMI complet additionné de 15 % de SFB. Puisqu'il a été rapporté que les hétérohybridomes hamster-souris pouvaient perdre leur fonction sécrétrice plus facilement que les hybridomes souris-souris, le maintien de cette fonction a été vérifié tout au long de la production de surnageant par la technique d'immunoblot (voir section 6).

Le surnageant récolté a été centrifugé à 600 g pendant 10 min. Les contaminants tels les fragments cellulaires, les acides nucléiques et les lipides polaires ont été éliminés par l'addition de Biocryl BPA-1000 (Supelco Canada, Oakville, Ontario, Canada) à raison de 1,25 ml pour 500 ml de surnageant de culture, sous agitation à la température ambiante pendant 15 min. Le surnageant a été ensuite centrifugé à 4000 g pendant 25 min (centrifugeuse Beckman, modèle J2-21M, rotor JA-10). Le surnageant ainsi obtenu a été concentré dans une cellule Amicon avec une membrane d'ultrafiltration PM30 (Diaflo, Amicon Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) jusqu'à environ 30 ml et dialysé contre du PBS pH 7,4. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 8000 g pendant 10 à 15 min (centrifugeuse Beckman, modèle J2-21M, rotor JA-21) puis filtré sur un filtre Millex-GV de 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA, USA).

Les AcM ont été purifiés sur colonne de protéine G Sépharose 4 Fast Flow (Pharmacia). Les AcM retenus sur la colonne ont été élués avec un tampon d'acétate d'ammonium (Fisher) 0,5 M pH 3,0 et récoltés dans un tube contenant 0,7 volume de tampon Tris.HCl 1 M pH 8,8 pour équilibrer le pH. La concentration d'AcM dans l'éluat a été calculée par une mesure de l'absorbance à 280 nm par la formule suivante : $A_{280} \div 1,34 = \text{concentration en mg/ml}$. L'éluat a ensuite été dialysé contre un tampon PBS pH 7,4 et concentré dans une cellule Amicon avec une membrane d'ultrafiltration PM10 Diaflo (Amicon). La solution d'AcM recueillie a été conservée dans du PBS contenant 0,02 % de NaN_3 , ou alors filtrée sur un filtre Millex-GV de 0,22 µm (Millipore) si l'AcM devait être utilisé stérilement ou sans azoture de sodium.

Pour la conjugaison à la biotine, la solution d'AcM ajustée à une concentration de 1 mg/ml a été dialysée contre un tampon NaHCO_3 0,1 M pH 8,0 à 8,3. La N-Hydroxysuccinimidobiotine (Sigma) a été dissoute dans du diméthyle sulfoxyde (DMSO, Sigma) à une concentration de 1 mg/ml, et 120 μl de cette solution ont été ajoutés à 1 mg d'AcM à conjuguer. La réaction s'est produite à la température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 2 h. L'AcM biotinylé a ensuite été dialysé contre un tampon PBS pH 7,4 et conservé à 4°C dans du PBS pH 7,4 contenant 0,02 % de NaN_3 . Pour la conjugaison au FITC, la solution d'AcM a été dialysée contre un tampon NaHCO_3 0,2 M, Na_2CO_3 0,08 M (Sigma) pH 9,5. La fluorescéine isothiocyanate (FITC, Sigma) a été dissoute dans du DMSO à une concentration finale de 10 mg/ml et 100 μg de FITC ont été ajoutés à 1 mg d'AcM à conjuguer. La réaction s'est produite pendant 3 h à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Les AcM conjugués ont été séparés du FITC libre par filtration sur une colonne Sephadex PD-10 en utilisant du PBS pH 7,4 pour l'éluion des AcM-FITC. Les AcM-FITC ont été conservés dans du PBS pH 7,4 contenant 0,02 % de NaN_3 .

9.5 Préparation des fragments F(ab')_2

Les AcM à digérer ont été précipités au sulfate d'ammonium à 50 % de saturation ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma) et la solution a été centrifugée à 8000 g pendant 20 min (centrifugeuse Beckman, modèle J2-21M, rotor JA-21). Les AcM ont été repris dans un tampon d'acétate de sodium 0,1 M ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$, Fisher Scientific) pH 4,2 de façon à obtenir une concentration protéique

finale de 2 mg/ml. La pepsine (Sigma), à une concentration de 1 mg/ml a été ajoutée aux AcM à un rapport de 1 : 33. La digestion a été poursuivie à 37°C pendant 3 h ou 5 h 30 min, selon les AcM à digérés. La réaction a été arrêtée par l'addition de 0,14 volume d'un tampon Tris.HCl 1 M, pH 8,8. La solution a été concentrée sur Centricon-30 (Amicon) jusqu'à un volume de 800 µl et filtrée sur gel de Superose 6 (Pharmacia) en éluant avec du PBS pH 7,4, pour éliminer l'enzyme. Les fragments F(ab')₂ ont été purifiés par une colonne de protéine A Sépharose, qui retient les AcM non digérés.

10. MARQUAGES DES CELLULES POUR ANALYSES DE CYTOMÉTRIE EN FLUX

10.1 Pour le phénotypage

Les cellules spléniques enrichies en cellules NK de la souche de souris désirée ou les lymphocytes de rat ont été lavés deux fois dans une solution de PBS sans calcium ni magnésium (Gibco BRL), contenant 1 % de BSA (Boehringer Mannheim) et 0,2 % de NaN₃. Les cellules ont ensuite été réparties à raison de 2 x 10⁵ cellules par tube pour les cellules NK de souris et de 5 x 10⁵ cellules par tube pour les cellules de rat. L'AcM-biotine désiré a été ajouté à la concentration prédéterminée dans un volume de 50 µl pour une incubation de 30 min à 4°C (un volume de 100 µl a été utilisé pour les expériences avec les souris congéniques et congéniques recombinantes et avec les lymphocytes de rat). Les cellules ont été lavées deux fois avec la solution de PBS-BSA-NaN₃ et incubées pendant 30 min à 4°C avec 30 µl d'une

dilution 1 : 10 de streptavidine-R-phycoérythrine (Gibco BRL). Les anticorps contrôles (PharMingen, San Diego, CA, USA) conjugués à la biotine ont été ajoutés aux mêmes concentrations que les anticorps auxquels ils correspondent . Les cellules ont été ensuite lavées une fois avec la solution de PBS-BSA- NaN_3 et fixées dans 500 μl de paraformaldéhyde 1 %. L'analyse des cellules a été effectuée sur un cytofluoromètre XL de Coulter et un total de 10000 cellules par échantillon ont été analysées.

10.2 Pour les expériences de compétition

Les cellules NK enrichies de BALB/c ont été lavées deux fois avec une solution de PBS, BSA 1 %, NaN_3 0,2 % et réparties à raison de 2×10^5 cellules par tube. La quantité prédéterminée de l'AcM non marqué désiré a été ajoutée aux cellules dans un volume de 100 μl pour une incubation de 30 min à 4°C. Les cellules ont été lavées deux fois avec la solution de PBS-BSA- NaN_3 . L'AcM-FITC désiré a ensuite été ajouté dans un volume de 50 μl pour une incubation de 30 min à 4°C. L'AcM 4LO3311-FITC a été utilisé à une dilution de 1 : 50 (0,5 μg), l'AcM A5 à une dilution de 1 : 250 (75 ng) et l'AcM F4 à une dilution de 1 : 10 (4,5 μg). Les anticorps contrôles (PharMingen, San Diego, CA, USA) ont été utilisés à des quantités équivalentes aux AcM auxquels ils correspondent. Les cellules ont été lavées deux fois avec la solution de PBS-BSA- NaN_3 et fixées dans 500 μl de paraformaldéhyde 1 %. L'analyse des cellules a été effectuée sur un cytofluoromètre XL de Coulter et un total de 10 000 cellules par échantillon ont été analysées.

11. EFFET DES AcM A5 ET F4 SUR LA LYSE DES CELLULES P815 PAR LES CELLULES LAK DE BALB/c

Chaque test a été effectué en triplicata dans un plateau de 96 puits à fonds ronds (Linbro, Flow Laboratories, McLean, Virginie, USA), à des rapports cellules effectrices : cellule cible (E : C) de 10 : 1, 5 : 1, 2,5 : 1 et 1,25 : 1.

11.1 Préparation des cellules effectrices

Les cellules LAK adhérentes et non adhérentes d'une culture de six jours ont été récoltées, lavées trois fois avec du milieu RPMI complet contenant 10 % de SFB et resuspendues dans le même milieu de manière à obtenir une concentration de 2×10^6 cellules/ml. Un volume de 100 μ l de la suspension de cellules LAK a été déposé en triplicata dans le premier puits (rapport E : C de 10 : 1). Les autres puits (soit les rapports E : C de 5 : 1, 2,5 : 1 et 1,25 : 1) ont été remplis en triplicata en effectuant des dilutions 1 : 2 avec 50 μ l des cellules du premier puits, dans du milieu RPMI-10 % de SFB. Chaque puits contenait alors 50 μ l.

11.2 Préparation des cellules cibles

Des cellules P815 en croissance exponentielle ont été récoltées d'un flacon de 25 cm², resuspendues dans du milieu HBSS et comptées. Un total de 5×10^6 cellules ont été marquées avec 100 μ Ci de chromate de sodium radioactif (⁵¹Cr, ICN Radiochemicals) pendant 1 h à 37°C. Les cellules ont

été ensuite lavées quatre fois avec du milieu HBSS, comptées et leur concentration a été ajustée à 1×10^5 cellules/ml dans du milieu RPMI-10 % de SFB.

11.3 Test de cytotoxicité

Les AcM A5, ou F4, ou 4LO3311, ou les fragments F(ab')₂ correspondants, ou les anticorps contrôles IgG3 de souris ou IgG de hamster ont été ajoutés en triplicata dans les puits contenant 50 µl de cellules LAK, à raison de 500 ng dans 50 µl, et ce, pour chaque rapport E : C. Comme mesure de la lyse sans anticorps, 50 µl de RPMI-10 % de SFB à été ajouté à 50 µl de cellules LAK en triplicata pour chaque rapport E : C (total de 12 puits). Le plateau de 96 puits a ensuite été incubé pendant 45 min à 4°C, avant d'ajouter 100 µl de la suspension cellulaire de cellules P815 marquées au ⁵¹Cr dans chaque puits contenant des cellules LAK. Quatre puits ont été remplis avec 100 µl de cellules P815 marquées au ⁵¹Cr et 100 µl de RPMI-10 % de SFB, comme mesure de la libération spontanée. Comme mesure de la libération maximale, quatre autres puits ont été remplis avec 100 µl de cellules P815 marquées au ⁵¹Cr et 100 µl de Triton X-100 2 %. Comme mesure de la radioactivité totale, quatre puits contenant 75 µl de cellules P815 marquées au ⁵¹Cr ont été mis de côté. Les plateaux ont été centrifugés à 170 g pendant 1 min et ensuite incubés pendant 4 h à 37°C, 5 % de CO₂. À la fin de l'incubation, les plateaux ont été centrifugés à 1000 g pendant 2 min et un volume de 150 µl de chaque surnageant a été prélevé. La radioactivité de chaque échantillon a été comptée pendant 30 s sur un

compteur Gamma 7000 (Beckman, Irvine, CA, USA). Le pourcentage de cytotoxicité a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = \frac{\text{CPM (test)} - \text{CPM (LS)}}{\text{CPM (LM)} - \text{CPM (LS)}} \times 100$$

où

LS = libération spontanée

LM = libération maximale

RÉSULTATS

1. IMMUNISATIONS DES HAMSTERS

1.1 Justification du choix des protocoles d'immunisation

La préparation antigénique préférentiellement utilisée pour l'immunisation d'animaux dans le but de produire des anticorps monoclonaux est évidemment un antigène purifié. Dans ces conditions, la majorité des hybridomes obtenus après la fusion des cellules de l'animal immunisé avec des cellules myélomateuses devraient sécréter des AcM de la spécificité voulue. Dans le cas qui nous intéresse ici, l'immunisation d'un hamster Armenian avec l'antigène NK2 purifié par chromatographie d'affinité accompagné d'un adjuvant s'est avérée infructueuse. Comme il n'existe pas de lignée cellulaire NK2.1⁺, il fallait extraire l'antigène à partir de cultures primaires de cellules stimulées par l'IL-2 ; nous nous sommes aperçu que la quantité d'antigène qui aurait été nécessaire pour obtenir une réponse immunitaire satisfaisante était trop coûteuse à produire.

Nous avons entretemps mis au point la technique d'immunoblot, qui permettait le criblage très spécifique des surnageants d'hybridomes puisque que l'antigène NK2 purifié est utilisé dans cette technique. Il était alors possible d'envisager l'immunisation des hamsters avec les cellules NK entières. Les cellules NK enrichies de la souris BALB/c ont été utilisées pour la production d'anticorps anti-NK2 xénogéniques car ce sont les cellules de

cette souche qui, d'après la réactivité de l'AcM 4LO3311, présentent la plus forte intensité d'expression de l'antigène NK2.1 à la surface cellulaire et le pourcentage de cellule positives le plus élevé. D'autre part, le pourcentage de cellules qui expriment l'antigène NK2.1 ainsi que le niveau d'expression de l'antigène, sont plus élevés à la surface des cellules LAK qu'à la surface des cellules NK non activées (Gosselin *et al.*, 1993). Deux hamsters Armenian ont donc été immunisés avec des cellules LAK de BALB/c, dans le but de favoriser la réponse dirigée contre l'Ag NK2.1. Toutefois, il restait possible que l'antigène NK2.1 subisse un changement de conformation suite à l'activation des cellules par l'IL-2 et que certains épitopes diffèrent entre l'antigène exprimé sur des cellules fraîches et l'antigène exprimé sur des cellules LAK. Pour cette raison, quatre hamsters ont été immunisés avec les cellules NK non activées.

1.2 Vérification de la réponse des hamsters à l'antigène NK2

Il était primordial avant de procéder aux fusions de vérifier la présence, dans le sérum des hamsters, d'anticorps dirigés contre l'antigène reconnu par l'AcM 4LO3311. Le recours à un test quantitatif comme l'ELISA était impossible, puisque la quantité d'antigène NK2 purifié disponible était trop minime. L'utilisation de tests nécessitant une faible quantité d'antigène NK2 était donc nécessaire. Ces tests avaient toutefois le désavantage de n'être que qualitatifs.

La présence d'anticorps anti-NK2 dans le sérum des hamsters a d'abord été vérifiée par radioimmunoprécipitation d'un lysat de cellules spléniques de BALB/c enrichies en cellules NK avec les sérums immuns, en comparaison avec l'AcM 4LO3311 (résultats non illustrés). Malgré la présence d'une bande de même mobilité électrophorétique que celle obtenue avec l'AcM 4LO3311, les résultats étaient difficiles à interpréter étant donné le grand nombre de bandes précipitées par les sérums polyclonaux. La présence d'anticorps anti-NK2 dans les sérums de hamsters immunisés a donc été confirmée en testant ceux-ci par radioimmunoprécipitation de l'antigène NK2 purifié par chromatographie d'affinité (Fig. 2A). Ces résultats démontraient la présence, dans les sérums des hamsters, d'anticorps dirigés contre une molécule de même poids moléculaire que celle reconnue et précipitée par l'AcM 4LO3311. Cette réactivité est absente d'un sérum normal de hamster. Même si ces résultats ne donnaient pas d'indication précise quant à la quantité d'anticorps anti-NK2 présents dans le sérum des hamsters, ils permettaient de procéder avec confiance aux fusions avec les cellules spléniques des hamsters immuns.

Toutefois, il a été beaucoup plus avantageux de tester systématiquement les sérums de hamsters par la technique d'immunoblot (Fig. 2B). Une fois mise au point, cette technique s'est révélée plus rapide et économique que la radioimmunoprécipitation de l'antigène NK2 purifié par chromatographie d'affinité tout en étant aussi spécifique. Bien que le sérum normal de hamster donne un faible signal (puits B1), sans doute en raison d'un blocage incomplet après adsorption des antigènes sur la membrane, la réactivité des sérums de hamsters immunisés avec l'antigène NK2 est

FIGURE 2 Exemples de tests de radioimmunoprécipitation et d'immunoblot pour détecter la présence d'anticorps anti-NK2 dans les sérums des hamsters immunisés

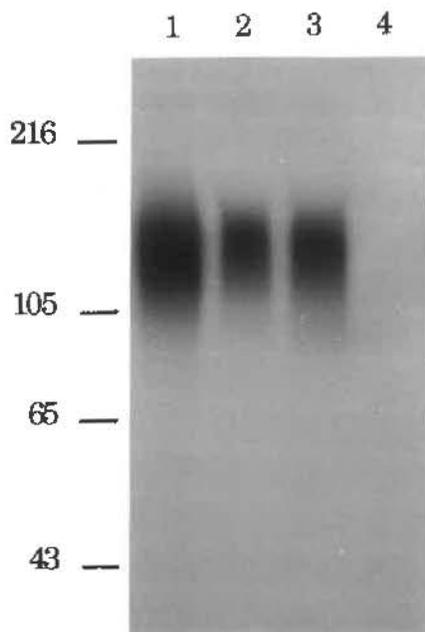
- A) Puits 1 : éluat de la colonne d'affinité précipité avec l'AcM 4LO3311
Puits 2-3 : éluat de la colonne d'affinité précipité avec les sérums des hamsters, utilisés dans les fusions # 2 et # 1 respectivement, après deux injections de cellules NK
Puits 4 : éluat de la colonne d'affinité précipité avec un sérum normal de hamster

- B) Tous les puits contiennent 0,2 µl de la solution d'antigène NK2.1 purifié, sauf le puits C1 qui contient 0,1 µg d'IgG de hamster (contrôle positif). Le puits A1 contient 0,3 µg d'AcM 4LO3311 (contrôle positif) et les puits B1 et C2, le sérum normal du hamster utilisé dans la fusion # 4, dilué 1 : 5 et des IgG2a de souris (AcM PK136 anti-NK1.1) (contrôles négatifs). Les sérums testés sont les suivants :

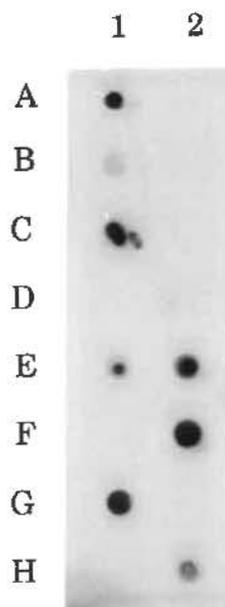
- G1 : sérum du hamster utilisé dans la fusion # 3, prélevé le jour de la fusion, dilué 1 : 5
E2 : sérum du hamster utilisé dans la fusion # 4, après 4 injections de cellules NK, dilution 1 : 5
F2 : même sérum que E2, dilution 1 : 2
H2 : sérum du hamster utilisé dans la fusion # 4, après 2 injections de cellules NK, dilution 1 : 5

Les puits non identifiés (D1, E1, F1, H1, A2, B2, D2 et G2) contenaient des échantillons non pertinents aux résultats présentés.

A)



B)



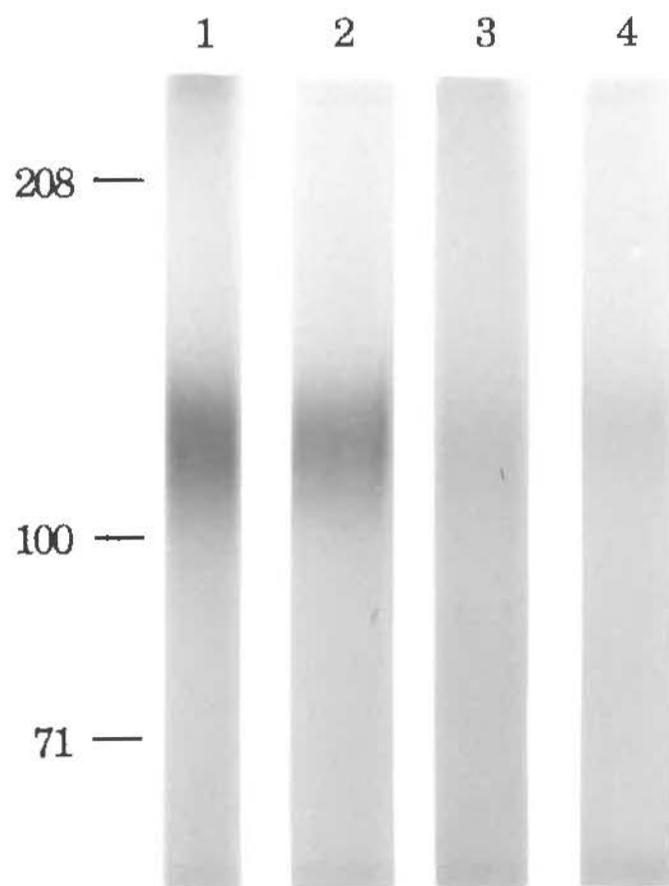
évidente lorsqu'elle est présente (puits G1, E2, F2 et H2). Le test permet en outre de détecter une variation dans la quantité d'anticorps présents, comme le montre la différence dans l'intensité du signal pour les dilutions 1 : 5 et 1 : 2 du sérum du hamster utilisé dans la fusion # 4 (puits E2 et F2). Les hamsters ayant répondu trop faiblement ont reçu une dose supplémentaire de cellules NK ou LAK. Tous les animaux immunisés ont été utilisés individuellement pour les fusions.

2. VÉRIFICATION DE LA PURETÉ DE LA PRÉPARATION D'ANTIGÈNE NK2 UTILISÉE POUR LES TESTS D'IMMUNOBLOT

L'étape cruciale dans la démarche expérimentale rapportée dans ce mémoire était la sélection des hybridomes sécrétant des anticorps reconnaissant l'antigène NK2 par le test d'immunoblot. Aussi, la pureté de la préparation d'antigène NK2 utilisée pour ce test a-t-elle été vérifiée, avant de commencer le criblage des surnageants d'hybridomes. Pour ce faire, l'efficacité de la colonne d'affinité 4LO3311-Sépharose avec laquelle l'antigène est purifié a été évaluée en analysant chaque étape de purification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (Fig. 3). Dans chaque éluat (puits 2 et 3), on retrouve une bande unique, de même poids moléculaire que la bande habituellement précipitée par l'AcM 4LO3311 (130 kDa), démontrant ainsi que le produit de la purification par la colonne d'affinité est exempt de contaminant. L'absence de contaminant dans les éluats est due à ce que la colonne 4LO3311-Sépharose retient uniquement l'antigène NK2, comme l'indique l'absence de bande parasite dans cet

FIGURE 3 Vérification de la pureté de la préparation d'antigène NK2
utilisée pour les tests d'immunoblot

- Puit 1 : gel 4LO3311-Sépharose avant élution
- Puit 2 : première élution
- Puit 3 : deuxième élution
- Puit 4 : gel 4LO3311-Sépharose après élution



extrait (puits 1). Tel qu'illustré dans le puits 4, l'antigène retenu sur la colonne d'affinité est presque totalement élué après deux traitements. La presque totalité de l'antigène retenu par la colonne est d'ailleurs récupérée avec la première élution.

La préparation d'antigène a donc été jugée adéquate pour identifier par immunoblot les hybridomes sécrétant des anticorps anti-NK2. La spécificité au niveau du criblage des surnageants d'hybridomes est capitale, puisque des anticorps dirigés contre une seule molécule sont recherchés alors que les hamsters ont été immunisés avec les cellules NK ou LAK entières, ce qui représente une grande variété de molécules immunogènes.

3. FUSIONS ET CRIBLAGE DES SURNAGEANTS D'HÉTÉROHYBRIDOMES

Un total de six fusions entre les cellules spléniques de six hamsters Armenian immunisés avec les cellules NK ou LAK de BALB/c et les cellules des lignées myélomateuses murines P3X63Ag8.653 ou SP2/0-Ag14 ont été effectuées (Tableau III).

Lors de la première fusion, les cellules spléniques de hamster ont été fusionnées aux cellules SP2/0-Ag14 à un ratio de 5 : 1. Des cellules nourricières NIH/3T3 irradiées ont été ajoutées au jour 5 de la fusion pour aider la croissance des hybridomes. Au jour 7, seulement 14 puits contenaient des hybridomes. Seulement neuf surnageants d'hybridomes ont

TABLEAU III. RÉSUMÉ DES FUSIONS ENTRE LES CELLULES SPLÉNIQUES DE HAMSTERS IMMUNISÉS AVEC LES CELLULES NK OU LAK DE SOURIS BALB/c ET DES CELLULES MYÉLOMATEUSES MURINES

Fusion	Immuno-gène	Partenaire de fusion	Nombre de plateaux	Nombre de cellules par puits au jour 0 (x 10 ⁵)	% de croissance ^a	Puits positifs au criblage	Nombre de positifs/ nombre de puits testés
# 1	NK	SP2/0-Ag14	1	2,4	14 %	---	0/9
# 2	NK	SP2/0-Ag14	1	5	84 %	---	0/92
# 3	NK	SP2/0-Ag14	1	5	ND	---	0/96
# 4	NK	SP2/0-Ag14	3	2,6	45 %	---	0/101
# 5	LAK	P3X63Ag8.653	5	0,7	78 %	F4	1/452
			1	1,8	85 %	---	0/89
			2	1,0	14 %	A5	1/3
# 6	LAK	SP2/0-Ag14	4	0,9	50 %	---	0/159
		P3X63Ag8.653	4	0,9	84 %	<u>A10</u>	<u>1/270</u>

a : Représente le pourcentage de puits où il y a croissance d'hybridomes. Le pourcentage de croissance est calculé entre les jours 6 et 10. Dans le cas des fusions 3, 4, 5 et 6, le pourcentage moyen est indiqué lorsque le nombre de plateaux est plus grand que 1.

pu être testés au jour 19, puisque plusieurs hybridomes mouraient avant d'avoir atteint un pourcentage de croissance satisfaisant pour le test d'immunoblot. Aucun des surnageants d'hybridomes testés n'était positif pour l'antigène NK2. Une surcroissance des fibroblastes de hamster qui s'intensifiait avec le nombre de jours post-fusion a été observée. Nous avons émis l'hypothèse que c'était probablement la cause de la non croissance des hybridomes.

Les cellules spléniques de hamster ont été fusionnées aux cellules SP2/0-Ag14 à un rapport cellules spléniques : cellules myélomateuses de 5 : 1 pour la deuxième fusion. L'ajout de cellules nourricières nous a paru inutile, étant donné que les cellules NIH-3T3 sont des fibroblastes et que nous savions maintenant que les fibroblastes étaient très abondants dans les rates de hamster. Suite à cette très forte contamination par les fibroblastes lors de la première fusion, la rate a été triturée par écrasement, sans utiliser de pinces. Ceci dans le but de limiter la libération des cellules non lymphoïdes, même si ceci devait diminuer le rendement de cellules récoltées de 30 % par rapport à la première fusion. La croissance des hybridomes a été favorisée par ce traitement, comme en témoigne le pourcentage de croissance de 84 %. Les surnageants d'hybridomes ont été criblés plus tôt que dans le cas de la première fusion, dans l'espoir de pouvoir cloner les hybridomes positifs avant que le puits ne soit envahi de fibroblastes. Toutefois, sur 92 puits testés au jour 12 de la fusion, aucun hybridome ne sécrétait d'anticorps anti-NK2. L'envahissement des puits par les fibroblastes a été retardé dans cette fusion par rapport à la première.

Pour vérifier si l'absence d'anticorps anti-NK2 était réelle et ne provenait pas plutôt d'un problème général de fusion entre les cellules SP2/0-Ag14 et les lymphocytes B de hamster, les surnageants d'hybridomes ont été testés au jour 14 pour la présence d'anticorps de hamster. Ce test a été rendu possible par une modification de la technique d'immunoblot. Brièvement, les surnageants d'hybridomes ont été incubés sur la membrane de nitrocellulose, sans antigène NK2 purifié, et les anticorps de hamster ont été révélés par une étape d'incubation supplémentaire avec un anticorps de lapin anti-Ig de hamster spécifique des chaînes lourdes et légères. Plusieurs puits contenaient effectivement des hybridomes sécréteurs (résultats non illustrés), ce qui nous permettait de conclure que le processus de fusion se déroulait normalement. Plusieurs hypothèses pouvaient alors être formulées pour expliquer l'absence d'anticorps anti-NK2 : soit que les lymphocytes B anti-NK2 en particulier n'avaient pas fusionné avec la cellule SP2/0-Ag14, soit qu'ils n'étaient pas assez abondants dans la rate de hamster, ou soit qu'ils fusionnaient, mais mouraient sous la pression de la croissance des fibroblastes avant d'avoir pu être testés.

Pour la troisième tentative, les cellules spléniques de hamster ont été fusionnées avec les cellules SP2/0-Ag14 à un rapport cellules spléniques : cellules myélomateuses de 10 : 1 dans le but de favoriser la fusion. Au jour 11, tous les puits ont été testés pour la présence d'anticorps NK2 par la technique d'immunoblot avec un résultat négatif. Le pourcentage de croissance des hybridomes était relativement satisfaisant, bien que l'envahissement par les fibroblastes semblait imminent. Comme stratégie pour limiter la surcroissance des fibroblastes et pouvoir retester les

hybridomes plus tard lorsque leur pourcentage de croissance serait plus élevé, les cellules du plateau de fusion ont été divisées 1 : 2 dans un autre plateau de 96 puits au jour 12 de la fusion. Cette opération a été effectuée doucement, dans le but de transférer surtout les hybridomes tout en laissant les fibroblastes, plus fortement attachés, dans le plateau original. Cette stratégie s'est toutefois avérée infructueuse, puisque le peu de fibroblastes qui avaient été transférés ont été suffisants pour empêcher la croissance des hybridomes dans le plateau de division. Dans le plateau original, les fibroblastes ont rapidement envahi les puits. Ces deux plateaux n'ont donc jamais passé par un deuxième criblage.

Lors du quatrième essai, les cellules spléniques de hamster ont encore été fusionnées aux cellules SP2/0-Ag14 à un rapport de 10 : 1, mais elles ont été distribuées dans trois plateaux de 96 puits au lieu d'un seul comme dans les trois premières fusions, et ce, dans le but de diluer les fibroblastes et d'ainsi retarder l'envahissement des puits. Malgré cela, les pourcentages de croissance des trois plateaux étaient de 47 %, 43 % et 45 % au jour 10 et aucun hybridome sécrétant des AcM anti-NK2 n'a été détecté. Les fibroblastes avaient réussi à envahir presque tous les puits au jour 17.

Face à l'impasse devant laquelle nous nous trouvions, des changements majeurs à la technique de fusion ont été apportés pour la fusion # 5. Les cellules spléniques d'un hamster immunisé avec des cellules LAK ont été fusionnées avec les cellules myélomateuses P3X63Ag8.653 à un rapport de 10 : 1. Dans les quatre premières fusions la lignée SP2/0-Ag14 avait été utilisée, plusieurs productions d'AcM de hamster après fusion avec

cette lignée ayant été rapportées dans la littérature. La lignée P3X63Ag8.653 a été utilisée cette fois-ci, car elle est beaucoup plus vigoureuse en culture que la lignée SP2/0-Ag14 et nous espérons que cette caractéristique permettrait d'obtenir des hétérohybridomes plus stables et plus résistants.

Autre modification, les cellules de rate ont été divisées en deux pour pouvoir effectuer deux fusions distinctes. Avec la première moitié, les cellules ont été transférées immédiatement après la fusion dans deux flacons de 75 cm² et cultivées pendant 20 h dans le but de faire adhérer les fibroblastes. Les cellules non adhérentes ont ensuite été réparties dans deux plateaux de 96 puits, ce qui correspond à une concentration finale d'environ 1×10^5 cellules par puits. Beaucoup d'hybridomes n'ont pas été transférés, puisque plusieurs avaient adhéré aux flacons. Pour la deuxième moitié de la rate, les cellules ont été réparties après la fusion dans six plateaux de 96 puits. Les cellules ont été distribuées dans un des plateaux à une concentration de $1,8 \times 10^5$ cellules par puits et dans les cinq autres plateaux à 7×10^4 cellules par puits. Des cellules nourricières NIH/3T3 irradiées avaient été distribuées dans les plateaux de 96 puits la journée précédant la fusion, pour assurer un environnement adéquat au petit nombre d'hybridomes qui se retrouveraient dans chaque puits.

La décision d'utiliser un plus grand nombre de plateaux de 96 puits dans la fusion # 5 fait suite à une discussion avec Michèle Pigeon, qui a collaboré à la production d'un hybridome hamster-souris dirigé contre le TCR $\alpha\beta$ murin (Kubo *et al.*, 1989). La suggestion qu'elle avait donné pour minimiser la croissance des fibroblastes était justement d'utiliser une

concentration cellulaire par puits beaucoup plus faible que celles utilisées normalement pour des fusion souris-souris et que celles utilisées jusqu'à maintenant dans notre système. Elle suggérait même de distribuer les cellules dans 10 à 20 plateaux de 96 puits pour une seule fusion. Dans les publications rapportant des fusions hamster-souris, la concentration finale par puits varie de 8×10^4 à $2,3 \times 10^6$ cellules par puits.

Deux hybridomes anti-NK2 ont été obtenus. L'hybridome F4 provient d'un des cinq plateaux contenant 7×10^4 cellules par puits et l'hybridome A5 provient d'un des deux plateaux contenant les cellules non adhérentes au plastique après l'incubation de 20 h. Seulement trois puits ont d'ailleurs pu être testés dans ces deux plateaux, très peu d'hybridomes ayant poussé (pourcentage de croissance de 14 %). Les hybridomes F4 et A5 ont été clonés trois fois par dilution limite. Un exemple d'application du test d'immunoblot pour le troisième clonage de l'hybridome F4 est illustré à la figure 4. Au troisième clonage, 92 % des puits contenant un(des) hybridome(s) F4 et 96 % des puits contenant un(des) hybridome(s) A5 étaient positifs pour l'antigène NK2, ce qui signifie que des lignées stables d'hétérohybridomes ont été obtenues.

Un sixième hamster immun étant disponible, la même technique de très grande dilution a été appliquée pour une dernière fusion, dans laquelle la moitié des cellules spléniques du hamster ont été fusionnées avec les cellules SP2/0-Ag14 à un rapport de 10 : 1, et l'autre moitié avec les cellules P3X63Ag8.653 à un rapport de 13 : 1. Il est alors devenu évident que l'utilisation des cellules P3X63Ag8.653 produit des hybridomes plus stables

FIGURE 4 Criblage des surnageants d'hybridomes pour la détection d'anticorps anti-NK2

Tous les puits contiennent 0,2 µl de la solution d'antigène NK2.1 purifié, sauf le puits C11 qui contient 0,1 µg d'IgG de hamster (contrôle positif). Le puits A1 contient 0,3 µg d'AcM 4LO3311 (contrôle positif) et les puits B11 et F5, des IgG2a de souris (AcM PK136 anti-NK1.1) et le surnageant de culture des cellules P3X63Ag8.653 (contrôles négatifs). Les surnageants testés se lisent de haut en bas et de gauche à droite :

- B1 à F3 : surnageants d'hybridomes du 1er clonage de B-2A10 (fusion # 6)
- G3 à F4 : dilutions sériées 1 : 2 du surnageant de A5 pour la production d'AcM
- G4 à E5 : dilutions sériées 1 : 2 du surnageant de F4 pour la production d'AcM
- G5 à H11 : surnageants d'hybridomes du 3ème clonage de F4 (fusion # 5), sauf B11 et C11.

et résistants que l'utilisation des cellules SP2/0-Ag14, comme en témoignent les pourcentages de croissance respectifs de 84 % et 50 %. Un autre hybridome a été sélectionné dans cette fusion, l'hybridome B-2A10. Toutefois, il est apparu ultérieurement que le surnageant de cet hybridome réagissait dans le test d'immunoblot en absence de l'antigène NK2. Le surnageant de B-2A10 ne réagissant pas non plus avec les cellules NK de BALB/c, tel que vérifié par cytométrie en flux (résultats non illustrés), il secrète donc vraisemblablement un anticorps d'une autre spécificité, réagissant avec le bloqueur utilisé dans le test ou encore avec la membrane de nitrocellulose. Une telle réaction peut s'expliquer par mimétisme moléculaire avec une protéine présente dans la suspension immunogène, ou alternativement par la fusion d'un lymphocyte B endogène non activé du hamster. Cet anticorps a été cloné, purifié, conjugué à la biotine et utilisé comme contrôle dans les analyses par cytométrie en flux de l'expression de l'antigène NK2 chez les souris congéniques et congéniques recombinantes (section 8) et chez le rat (section 9). Un exemple de l'application du test d'immunoblot dans le criblage d'une partie des puits du premier clonage de B-2A10 est illustré à la figure 4. La réactivité très intense et la dimension de la zone de réaction correspondant pratiquement à la surface du puits sont en accord avec la non spécificité anti-NK2 des anticorps contenus dans les puits positifs.

Les AcM A5, F4 et B-2A10 ont été purifiés à partir de surnageants de culture des hétérohybridomes correspondants. Les surnageants de culture contenaient 80 µg d'anticorps/ml pour A5, 40 µg/ml pour F4 et 20 µg/ml pour B-2A10. Le taux de sécrétion plus faible de F4 par rapport à A5 se reflète dans le test d'immunoblot, le signal positif étant plus rapidement perdu

dans le cas de F4 que dans le cas de A5, et ce pour des dilutions sériées 1 : 2 identiques (Fig. 4). Une partie des anticorps de chacun des hybridomes ont été purifiés puis conjugués à la biotine ou au FITC selon les méthodes décrites à la section 9.4 de la section matériel et méthodes.

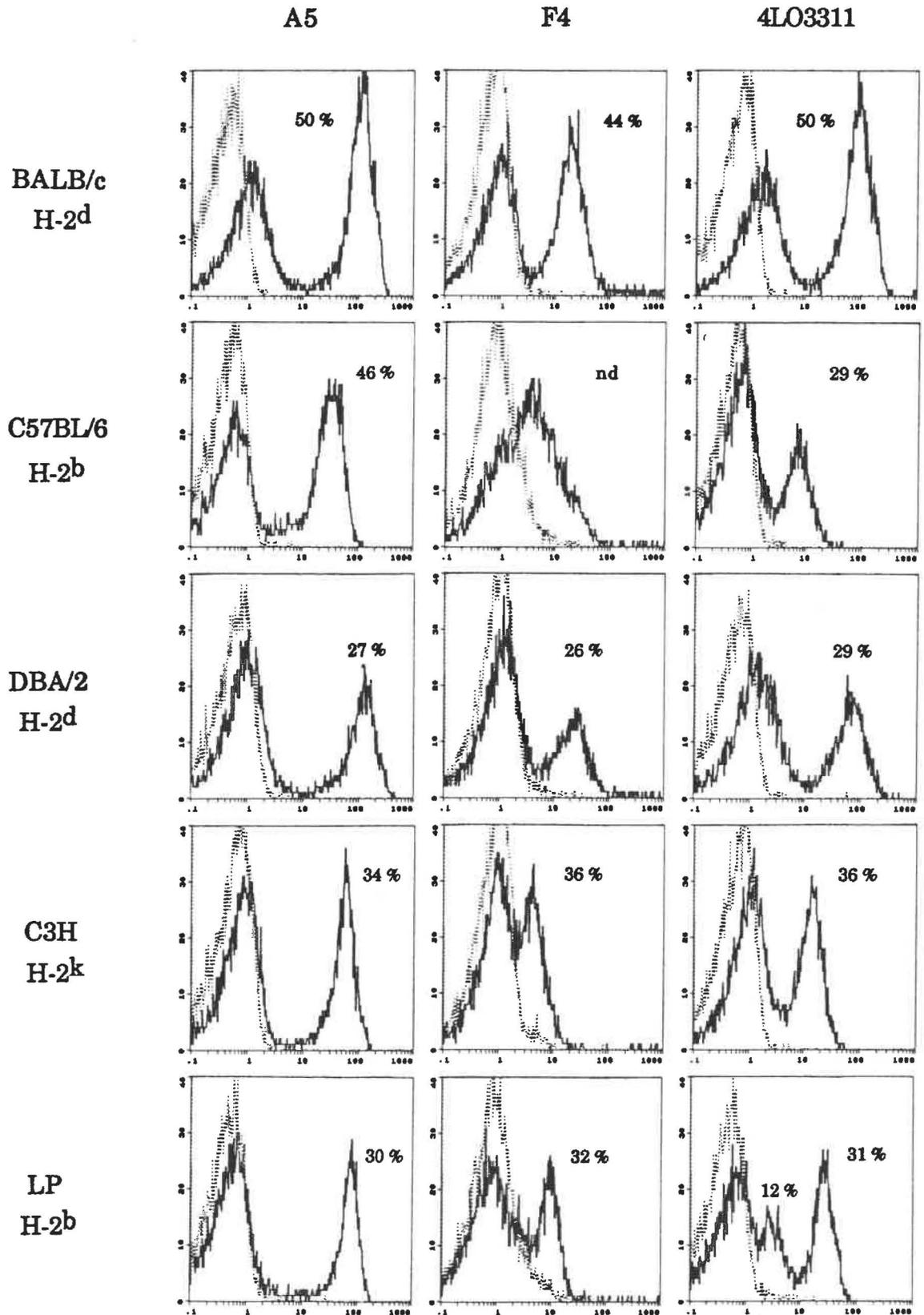
4. RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 AVEC LES CELLULES NK DE SOURIS DE DIFFÉRENTES SOUCHES

Une fois les AcM A5 et F4 conjugués à la biotine, la concentration optimale de chaque anticorps à utiliser pour les analyses de cytométrie en flux a été déterminée sur la base de leur réactivité avec les cellules spléniques de BALB/c enrichies en cellules NK. La réactivité optimale de l'AcM A5-biotine correspond à une concentration de 16 ng/2,5 x 10⁵ cellules, et celle de l'AcM F4-biotine à une concentration de 4,5 µg/2,5 x 10⁵ cellules. L'AcM 4LO3311-biotine, qui sert de référence, est utilisé à une concentration de 0,5 µg/2,5 x 10⁵ cellules. Toujours dans le cas de la souris BALB/c, le profil de réactivité obtenu avec l'AcM A5 est semblable à celui obtenu avec l'AcM 4LO3311, alors que l'AcM F4 détecte des cellules plus faiblement fluorescentes (Fig. 5).

D'après les travaux réalisés antérieurement dans notre laboratoire avec l'AcM 4LO3311, le pourcentage de cellules NK réagissant avec l'AcM 4LO3311 et le niveau d'expression de l'antigène varient d'une souche de souris à l'autre (Morelli *et al.*, 1992 et observations non publiées). Ceci est illustré dans les histogrammes de droite de la figure 5, chez cinq souches de souris différentes. Il était donc intéressant de vérifier si la même

FIGURE 5 Réactivité des AcM anti-NK2 de hamster avec les cellules spléniques enrichies en cellules NK de différentes souches de souris en comparaison avec la réactivité de l'AcM 4LO3311

Les histogrammes représentent le nombre relatif de cellules (ordonnée) en fonction de l'intensité de fluorescence, exprimée sur une échelle logarithmique (abscisse). Les cellules ont été marquées avec les AcM-biotine identifiés au dessus de chaque colonne d'histogrammes (traits pleins), ou avec les anticorps contrôles (traits pointillés), soient une IgG3 de souris et une IgG de hamster marquées à la biotine. Le pourcentage inscrit correspond au pic de cellules avec la plus forte intensité de fluorescence.



hétérogénéité se confirmerait aussi avec les deux nouveaux AcM anti-NK2. Comme dans le cas de l'AcM 4LO3311, les niveaux d'expression de l'antigène NK2 tel que détecté par chaque AcM de hamster, varient d'une souche de souris à l'autre. En général, le niveau d'expression détecté avec l'AcM A5 est plus élevé que celui détecté avec l'AcM 4LO3311, lui-même plus élevé que celui détecté avec l'AcM F4. Ces variations de niveau d'expression pourraient signifier que l'AcM A5 reconnaît plus de molécules à la surface des cellules que ne le fait l'AcM 4LO3311, qui en reconnaît lui-même plus que l'AcM F4. Or, les trois AcM devraient théoriquement tous reconnaître la même molécule, puisque les AcM de hamster ont été sélectionnés grâce à leur réactivité avec la molécule purifiée par l'AcM 4LO3311. Il est intéressant de remarquer que la concentration optimale d'AcM A5-biotine requise pour marquer un même nombre de cellules est 30 fois plus petite que celle utilisée pour l'AcM 4LO3311-biotine, qui est elle-même 9 fois plus petite que celle utilisée pour l'AcM F4-biotine. Habituellement, une très petite quantité d'AcM capable de marquer les cellules efficacement signifie une très forte affinité de l'AcM pour la molécule avec laquelle il réagit et vice-versa. Les variations de la position des pics sur l'échelle d'intensité de fluorescence pourraient donc être dûs à des différences d'affinité des trois AcM pour l'antigène NK2.

Sur tous les histogrammes illustrés dans la figure 5, les pourcentages inscrits s'appliquent aux pics correspondants à la population de cellules possédant la plus forte intensité de fluorescence. La population de cellules de faible intensité de fluorescence n'étant pas détectée dans tous les cas, et l'étude de cette population débordant du cadre du travail présenté dans ce

mémoire, les pourcentages de cellules y correspondant ne sont pas indiqués. Pour une souche de souris donnée, les trois AcM anti-NK2 réagissent avec le même pourcentage de cellules, sauf dans le cas de la souris C57BL/6. Pour l'AcM F4 chez cette souche de souris, il est difficile de délimiter la ou les populations positives, c'est pourquoi aucun pourcentage n'est inscrit. L'AcM A5 reconnaît 46 % des cellules spléniques enrichies en cellules NK de C57BL/6, alors que l'AcM 4LO3311 n'en reconnaît que 29 %. Ces résultats impliquent qu'il existe une population d'au moins 15 %, et pouvant aller jusqu'à 46 %, de cellules A5⁺4LO3311⁻. Le phénotype A5⁺4LO3311⁻ pourrait être dû à un camouflage de l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311 sur ces cellules. Une autre interprétation pourrait être que l'AcM A5 est apte à reconnaître sur les cellules A5⁺4LO3311⁻, une protéine qui n'exprime pas l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311. Cette analyse par cytométrie en flux ne permet pas de trancher entre ces interprétations. Une expérience de radioimmunoprécipitation avec les AcM anti-NK2 a permis d'apporter des éclaircissements (section 5).

Le cas de la souris LP est particulier. En effet, l'AcM 4LO3311 reconnaît une population additionnelle de cellules, non détectée par les deux autres AcM. Ceci pourrait être expliqué par des différences dans la nature des épitopes reconnus par les trois AcM. Les AcM A5 et F4 pourraient reconnaître des épitopes qui ne sont accessibles que sur la partie des cellules correspondant au pic de 31 % de l'AcM 4LO3311 et non sur la partie des cellules correspondant au pic de 12 %, possiblement à cause d'une association de l'antigène NK2 à une autre molécule. L'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311, quant à lui, serait accessible sur toutes les sous-populations

de cellules qui expriment l'antigène NK2, associé ou non à une autre molécule. Devant le genre de profils obtenus avec la souris LP ainsi qu'avec les autres souches de souris, et devant les interprétations possibles, nous avons décidé d'analyser la spécificité épitopique des trois AcM anti-NK2 par des expériences de compétition. Les résultats de ces expériences sont présentés à la section 6.

Une autre observation intéressante est tirée de la figure 5. Conformément à ce qui a été rapporté dans un manuscrit récemment soumis par notre laboratoire (Gosselin *et al.*, 1995), il semblerait qu'il existe une relation entre l'haplotype du CMH des souris et le niveau d'expression de l'antigène NK2.1 tel que reconnu par l'AcM 4LO3311. Cette même relation est remarquée avec les AcM A5 et F4. En effet, si on fait abstraction de la souris LP qui est un cas particulier, il semble que le niveau d'expression de l'antigène NK2 est plus élevé chez les souris d'haplotype H-2^d (BALB/c et DBA/2) que chez la souris d'haplotype H-2^k (C3H), qui elle-même présente un niveau d'expression plus élevé que la souris d'haplotype H-2^b (C57BL/6). A cette étape, il ne nous est pas permis d'imputer ces variations uniquement à une différence d'haplotype, puisque les souris utilisées diffèrent par bien d'autres caractéristiques. L'analyse de l'effet de l'haplotype du CMH sur l'expression de l'antigène NK2, étudié avec les trois AcM anti-NK2, est présentée à la section 8.

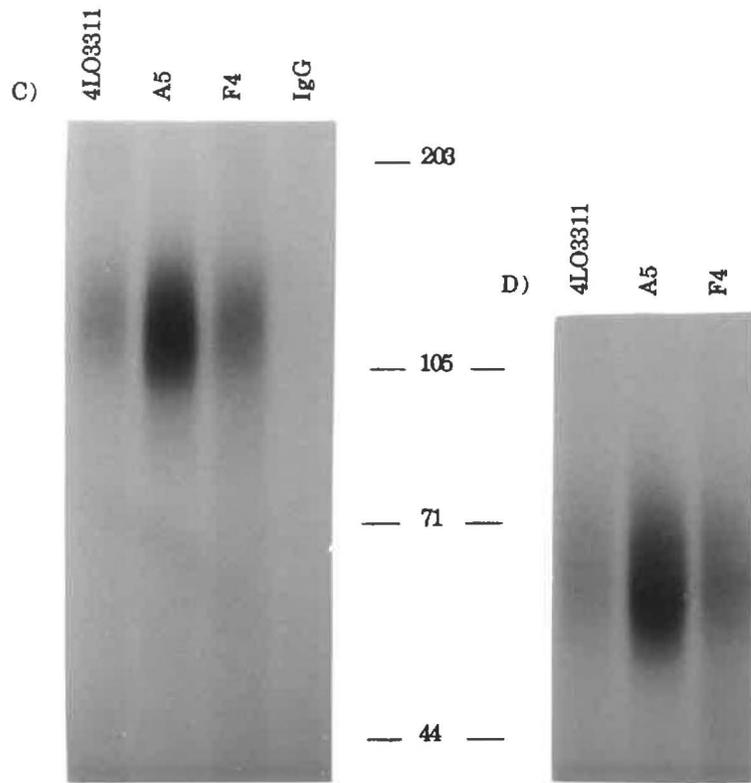
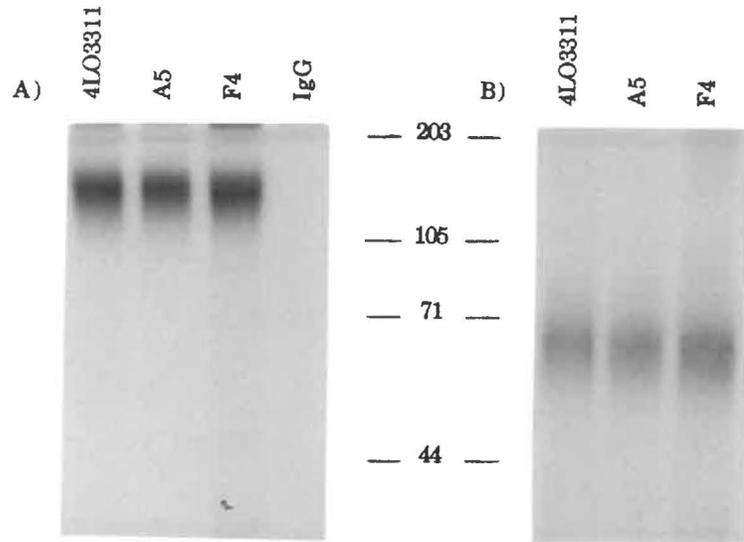
5. RADIOIMMUNOPRÉCIPITATION DES LYSATS DE CELLULES NK DE SOURIS BALB/c ET C57BL/6

Pour confirmer que les AcM de hamster reconnaissent bien la même molécule que l'AcM 4LO3311, un lysat de cellules spléniques de BALB/c enrichies en cellules NK a été immunoprécipité avec des quantités identiques des trois AcM anti-NK2. La souris BALB/c a d'abord été utilisée, l'immunisation des hamsters ayant été effectuée avec les cellules NK ou LAK de BALB/c et les AcM A5 et F4 ayant été sélectionnés sur la base de leur réactivité avec l'antigène NK2 purifié à partir de cette souris de souris. Les trois AcM anti-NK2 reconnaissent tous une molécule de même poids moléculaire chez la souris BALB/c (environ 130 kDa), qui se scinde en sous-unités d'environ 65 kDa en conditions réductrices (Fig. 6, A et B). Les bandes semblent toutes trois de même intensité, ce qui laisse supposer que les quantités de molécules précipitées sont équivalentes, malgré les différences d'intensité de fluorescence observées en cytométrie.

Un lysat de cellules spléniques enrichies en cellules NK de la souris C57BL/6 a été immunoprécipité avec les trois AcM anti-NK2 dans le but d'éclaircir le cas de la souris C57BL/6 par rapport aux résultats obtenus en cytométrie ; le fait que l'AcM A5 réagissait avec un pourcentage supérieur de cellules que l'AcM 4LO3311 suggérait l'existence d'une population A5⁺4LO3311⁻. Les résultats démontrent clairement que l'intensité de la bande de la protéine précipitée par l'AcM A5 est beaucoup plus forte que celle résultant de l'immunoprécipitation par l'AcM 4LO3311, suggérant ainsi qu'une plus grande quantité de molécules est précipitée par l'AcM A5

FIGURE 6 Radioimmunoprécipitation de lysats de cellules spléniques enrichies en cellules NK de souris BALB/c et C57BL/6, avec les AcM A5, F4 et 4LO3311

Les cellules spléniques enrichies en cellules NK de souris BALB/c (A et B) ou C57BL/6 (C et D) ont été utilisées pour l'immunoprécipitation. L'anticorps contrôle est une IgG de hamster utilisée à 50 µg pour 1×10^7 cellules. Les échantillons ont été traités en condition non réductrices (A et C) et réductrices (B et D).



que par l'AcM 4LO3311 (Fig. 6, C et D). Cette observation va à l'encontre de l'hypothèse du camouflage de l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311 sur les cellules A5⁺4LO3311⁻. En effet, si cette interprétation s'était révélée exacte, des bandes de même intensité auraient été obtenues avec les AcM A5 et 4LO3311, puisque dans la technique d'immunoprécipitation le camouflage d'épitope n'a pas lieu, les protéines étant précipitées une fois libérées de la surface cellulaire. Ces résultats suggèrent plutôt que l'AcM A5 pourrait définir une population A5⁺4LO3311⁻ parce qu'il reconnaît une protéine qui n'exprime pas l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311.

Bien que l'analyse par cytométrie en flux ait indiqué que la molécule reconnue par l'AcM F4 semble faiblement exprimée (Fig. 5), une protéine formant une bande d'intensité au moins aussi forte que la bande de la protéine précipitée par l'AcM 4LO3311 est précipitée par l'AcM F4 (Fig. 6 C et D). Ceci pourrait signifier que le site de liaison de l'AcM F4 est difficilement accessible lorsque la protéine est ancrée dans la membrane cellulaire. D'autre part, la faible affinité de l'AcM F4 pour son épitope pourrait aussi être en cause pour expliquer les résultats de cytométrie en flux.

6. COMPÉTITION DES AcM A5, F4 ET 4LO3311 ENTRE EUX

Ces expériences ont été entreprises dans le but de déterminer si les épitopes reconnus par les trois AcM anti-NK2 étaient distincts ou se chevauchaient complètement ou partiellement. Les expériences ont été

effectuées avec les AcM conjugués à la FITC plutôt qu'à la biotine, même si la force du signal de fluorescence s'en trouvait diminuée. La raison de ce choix est que le conjugué streptavidine-R-phycoérythrine (SA-PE) utilisé pour révéler les AcM conjugués à la biotine est d'un poids moléculaire de 240 kDa (Matsumoto B. Editor, 1993). Une molécule d'une telle taille pourrait avoir de la difficulté à atteindre un conjugué AcM-biotine dans le cas où un deuxième anticorps non conjugué est fixé sur un site voisin de la même molécule, et ainsi donner une fausse impression de compétition. La molécule de FITC ayant par contre un poids moléculaire de 389 Da, ce fluorochrome peut difficilement être responsable d'un encombrement stérique.

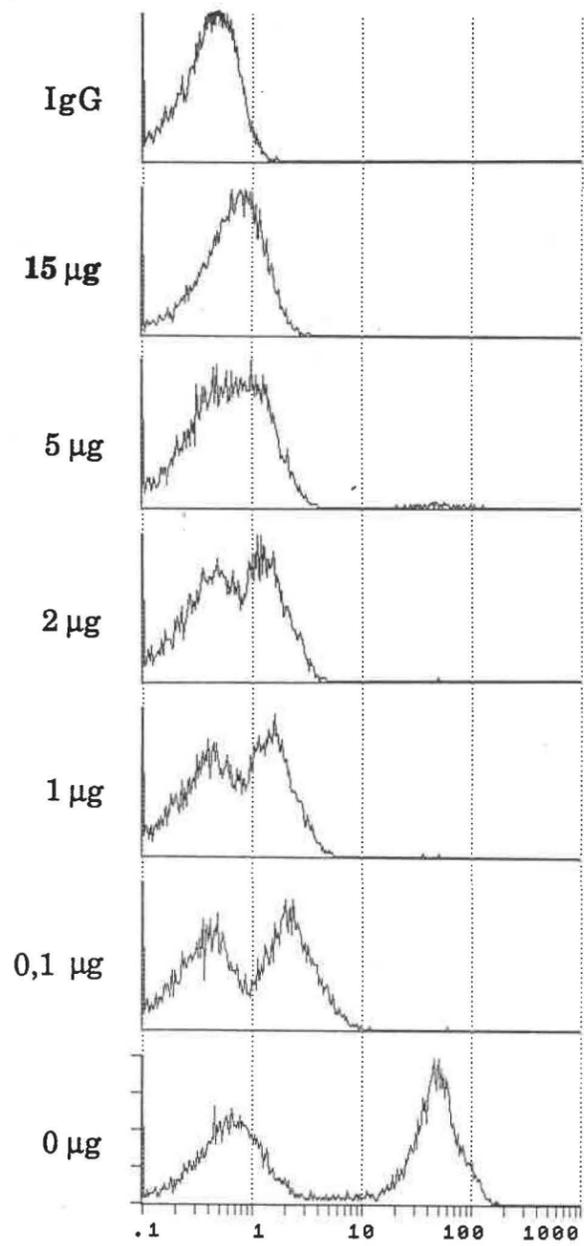
6.1 Observations préliminaires

La première étape a d'abord été de déterminer quelle était la quantité d'AcM non conjugué nécessaire pour inhiber la liaison de l'AcM-FITC correspondant, et ce, pour les trois AcM anti-NK2 (Fig. 7). Pour les AcM A5 et 4LO3311, 15 µg d'AcM non conjugué ont été suffisants pour inhiber de façon satisfaisante la liaison des AcM A5-FITC et 4LO3311-FITC. La liaison de l'AcM F4, qui semble posséder une affinité beaucoup plus faible que les deux autres pour l'antigène NK2, est beaucoup plus difficile à inhiber. Cette difficulté provient peut-être aussi d'une certaine inaccessibilité de l'épitope, comme le suggère d'ailleurs les résultats d'immunoprécipitation chez C57BL/6. La quantité d'AcM F4 non conjugué retenue pour inhiber la liaison de l'AcM F4-FITC est de 25 µg, bien que l'inhibition observée n'ait pas été

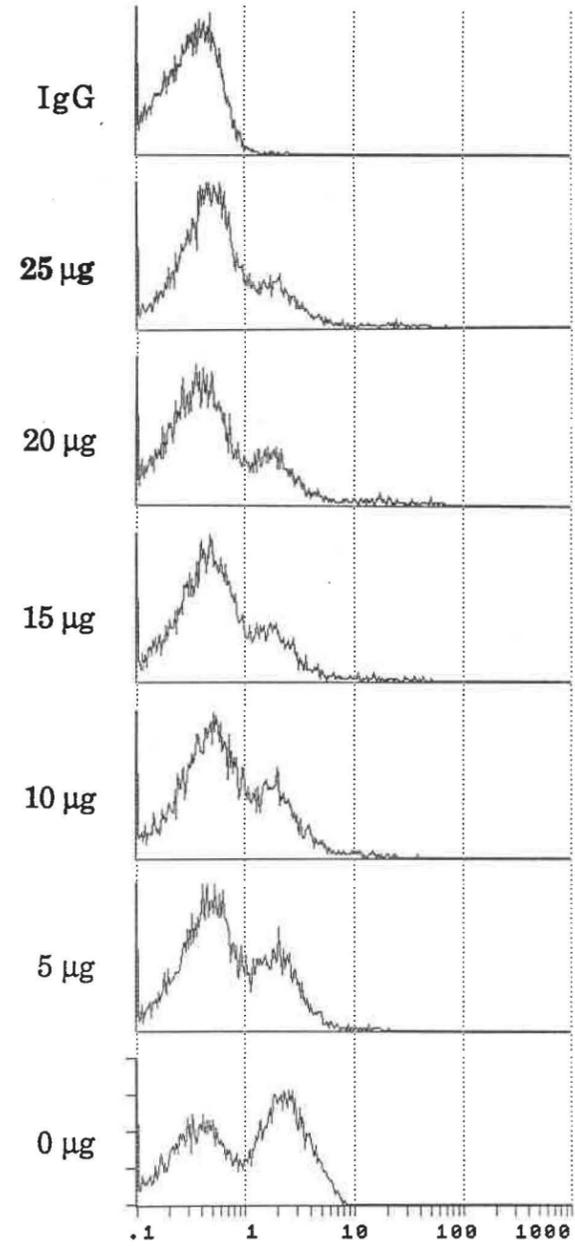
FIGURE 7 Mise au point des conditions expérimentales pour les tests de compétition entre les différents AcM anti-NK2

Cette figure représente le profil de la réaction des AcM-FITC indiqués en haut de chaque gamme avec les cellules spléniques enrichies en cellules NK de BALB/c, suite à une incubation des cellules avec la quantité d'AcM non conjugué indiquée à la gauche de chaque histogramme. Les histogrammes représentent le nombre relatif de cellules (ordonnée) en fonction de l'intensité de fluorescence, exprimée sur une échelle logarithmique (abscisse). La quantité d'AcM non conjugué qui a été choisie pour les expériences de compétition est indiquée en gras. Les histogrammes en haut de chaque gamme correspondent à la fluorescence décelée après incubation avec les anticorps contrôles marqués au FITC.

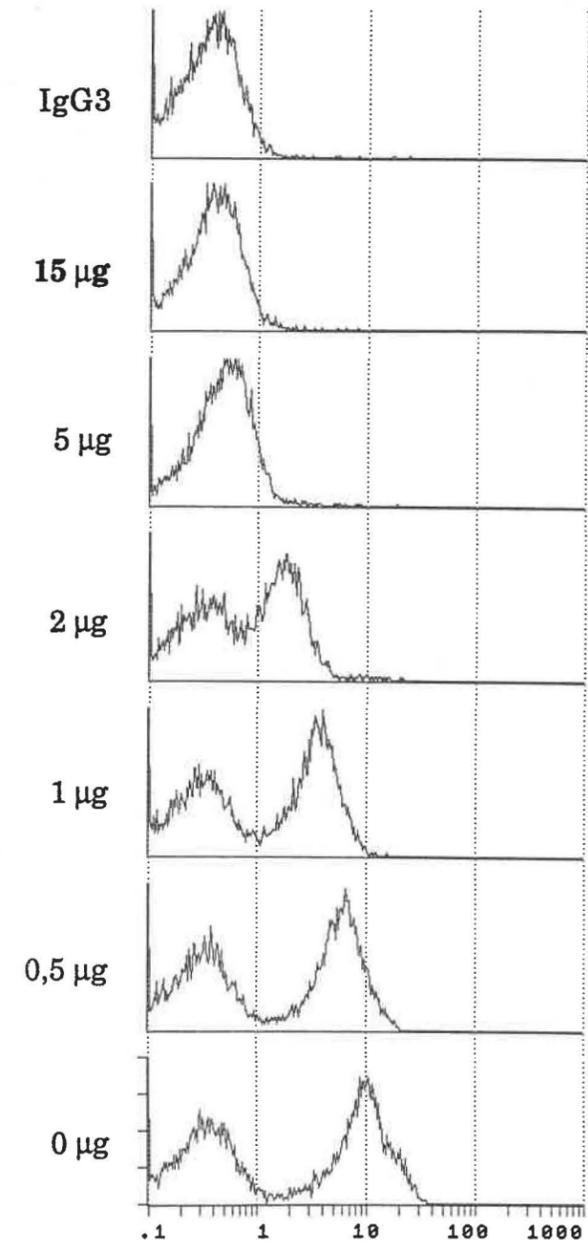
A5



F4



4LO3311



aussi complète que dans le cas des AcM A5 et 4LO3311. Une quantité supérieure à 25 µg ou un temps d'incubation plus long n'ont pas été efficaces pour inhiber la liaison de l'AcM F4-FITC ; de même, pour l'AcM A5, une quantité d'AcM plus grande que 15 µg n'a pas permis d'obtenir une inhibition plus complète (résultats non illustrés). Des quantités de 15 µg pour les AcM A5 et 4LO3311 et de 25 µg pour l'AcM F4 ont donc été utilisées pour les expériences de compétition.

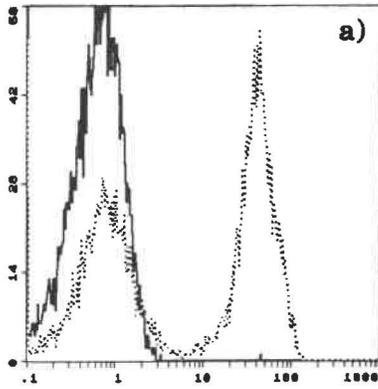
6.2 Compétition

Les histogrammes a et c de la figure 8 démontrent que, dans les conditions retenues, le blocage des sites de liaison des AcM A5 et 4LO3311 est complet. Tous les sites de l'AcM F4 ne sont toutefois pas bloqués (histogramme b) ; environ 40 % des cellules réagissent toujours avec l'AcM F4-FITC, quoique plus faiblement, après l'inhibition par l'AcM non marqué.

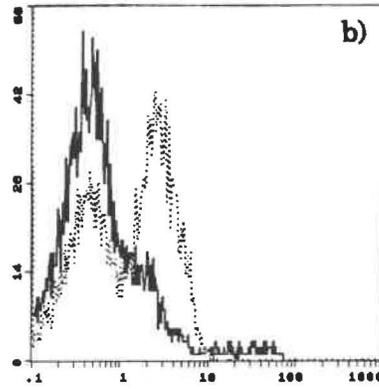
Comme les histogrammes g et i le démontrent, les AcM A5 et 4LO3311 n'entrent pas du tout en compétition. Les épitopes reconnus par ces deux AcM seraient donc de toute évidence distincts. L'AcM F4 entre par contre en compétition avec l'AcM A5-FITC comme avec l'AcM 4LO3311-FITC pour la liaison à l'antigène NK2 (histogrammes d et f). En effet, la population de cellules positives passe de 53 % à 22 % pour l'AcM A5-FITC et de 54 % à 21 % pour l'AcM 4LO3311-FITC. Si le blocage des sites de liaison de F4 était total, il serait possible que l'inhibition de la liaison des AcM A5-FITC et 4LO3311-FITC soit encore plus importante et peut-être même complète. Ces résultats

FIGURE 8 Compétition des AcM A5, F4 et 4LO3311 entre eux

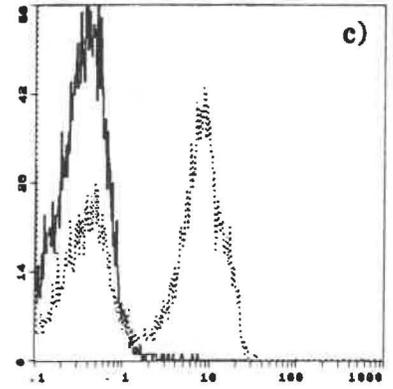
Les expériences de compétition ont été effectuées avec les cellules spléniques enrichies en cellules NK de BALB/c. Les histogrammes représentent le nombre relatif de cellules (ordonnée) en fonction de l'intensité de fluorescence, exprimée sur une échelle logarithmique (abscisse). Dans chaque histogramme, le trait plein représente le profil de la combinaison d'AcM non conjugué et d'AcM-FITC identifié sous l'histogramme. Le trait pointillé représente le profil sans inhibition de l'AcM-FITC dont il est question. Les trois histogrammes du haut représentent chaque AcM anti-NK2 inhibé par lui-même, avec les quantités d'AcM non conjugué indiquées dans la légende de la figure 7. Les six autres histogrammes représentent les résultats de la compétition des trois AcM entre eux.



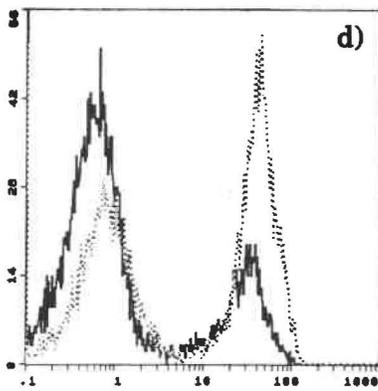
A5 + A5-FITC



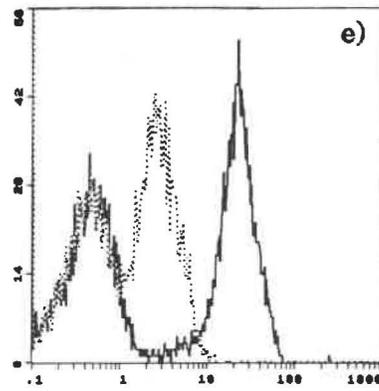
F4 + F4-FITC



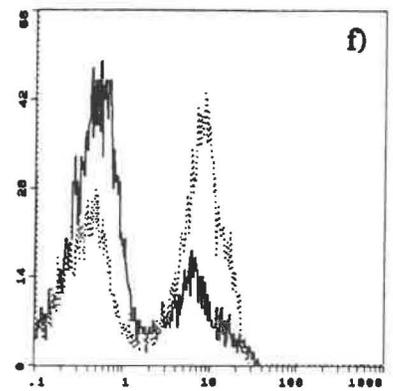
4LO3311 + 4LO3311-FITC



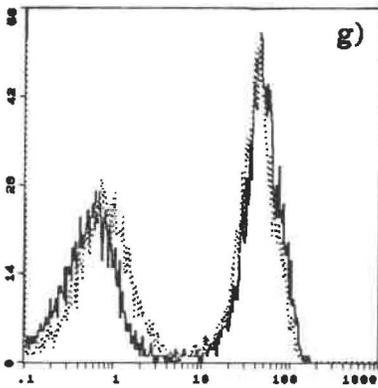
F4 + A5-FITC



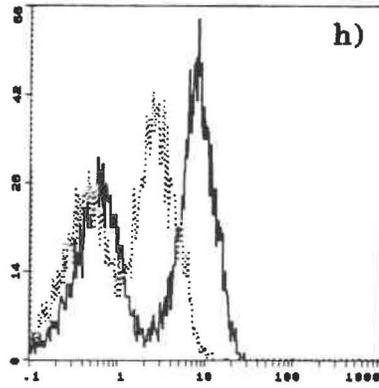
4LO3311 + F4-FITC



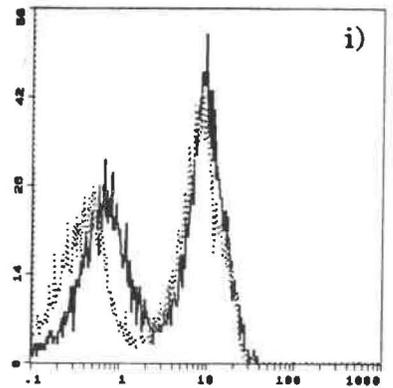
F4 + 4LO3311-FITC



4LO3311 + A5-FITC



A5 + F4-FITC



A5 + 4LO3311-FITC

suggèrent que le site de liaison de l'AcM F4 chevauche les deux sites de liaison distincts des AcM A5 et 4LO3311.

Puisque l'AcM F4 entre en compétition avec les AcM A5-FITC et 4LO3311-FITC pour la liaison à leur épitope, la liaison des AcM A5 et 4LO3311 devrait empêcher la liaison de l'AcM F4-FITC. Les histogrammes e et h démontrent que ce n'est toutefois pas le cas. De façon surprenante, la liaison préalable de l'AcM A5 comme de l'AcM 4LO3311 aux cellules NK de BALB/c, fait augmenter la liaison de l'AcM F4-FITC, sans toutefois faire varier le pourcentage de cellules positives. Cet effet est en outre nettement plus prononcé avec l'AcM 4LO3311 qu'avec l'AcM A5.

Devant des résultats aussi surprenants, deux expériences contrôles ont été effectuées pour vérifier si une telle augmentation de la réactivité de l'AcM F4-FITC était spécifique à la liaison des AcM A5 et 4LO3311. La première vérification a été effectuée avec la souris BALB/c et un anticorps anti-Ly-5.2, qui est non spécifique à l'antigène NK2 mais réagit avec toutes les cellules NK. L'incubation des cellules avec 15 µg d'anticorps anti-Ly-5.2, bien qu'inhibant complètement la liaison de l'anticorps Ly-5.2-FITC, n'a eu aucun effet sur le profil de réactivité de l'AcM F4-FITC, confirmant ainsi que l'effet des AcM A5 et 4LO3311 est spécifique (résultats non illustrés). La deuxième expérience contrôle a été effectuée sur les cellules NK de la souris C57BL/6. Comme dans le cas de la souris BALB/c, il s'est avéré que le signal décelé par l'AcM F4-FITC était augmenté par l'incubation préalable des cellules NK avec 15 µg d'AcM A5 ou 4LO3311. De plus, la liaison de l'anticorps anti-Ly5.2 en remplacement des AcM A5 ou 4LO3311 n'a eu

aucun effet sur le profil de réaction de l'AcM F4-FITC (résultats non illustrés). Ces expériences confirment donc que le déplacement du pic décelé par l'AcM F4-FITC, attribuable à la liaison préalable des AcM A5 ou 4LO3311, est dû à leur spécificité épitopique.

7. RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 AVEC LES CELLULES NK DE LA SOURIS NZB

Comme il a été mentionné à la section 4, les travaux avec l'AcM 4LO3311 ont démontré une hétérogénéité dans l'expression de l'antigène NK2 par les cellules NK de diverses souches de souris. En plus de la diversité dans les niveaux d'expression et les pourcentages de cellules positives chez les souches de souris réagissant avec l'AcM 4LO3311, les cellules NK de plusieurs souches de souris ne réagissent pas avec l'AcM 4LO3311. Parmi celles-ci se trouvent les souches MA/My, CE et NZB. Les souris de la souche NZB sont les plus faciles à obtenir.

Les AcM anti-NK2 de hamster semblent réagir avec des épitopes différents de l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311, du moins l'AcM A5, il était possible que l'un d'eux puisse détecter une forme allélique de l'antigène NK2.1, qui serait présente chez les souches de souris ne réagissant pas avec l'AcM 4LO3311. Le choix de la souris NZB pour la recherche d'une forme allélique est judicieux, étant donné que le premier réactif produit dirigé contre l'antigène NK2.1 était un sérum NZB anti-BALB/c (Pollack et Emmons, 1982).

7.1 Analyse par cytométrie en flux

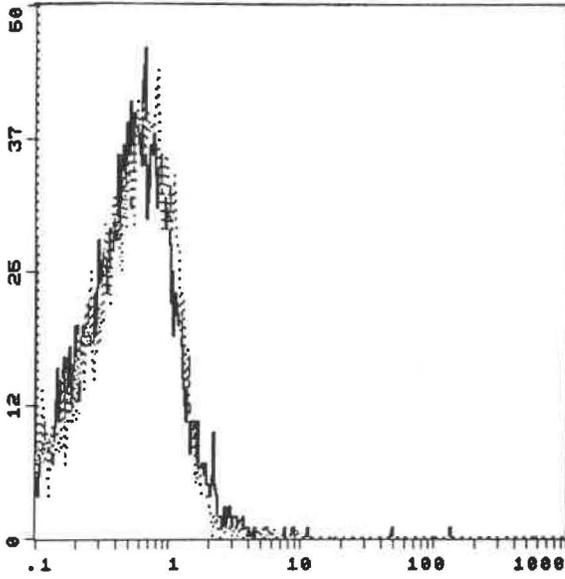
La présence d'une forme allélique de l'antigène NK2.1 a donc été recherchée chez la souris NZB. Les résultats des analyses par cytométrie en flux sur les cellules spléniques enrichies en cellules NK démontrent clairement une réactivité de l'AcM F4 (Fig 9). L'AcM A5 se comporte comme l'AcM 4LO3311, qui, comme il avait déjà été démontré, ne réagit pas avec les cellules NK de la souris NZB. À titre de contrôle positif et comme base de comparaison, la réactivité de l'AcM PK136, dirigé contre l'antigène NK1.1 est illustrée. L'AcM F4 réagit avec 45 % des cellules spléniques enrichies en cellules NK, alors que l'AcM PK136 réagit avec 72 % des mêmes cellules. De plus, le niveau d'expression de l'antigène NK2 reconnu par l'AcM F4 est plus faible que celui de l'antigène NK1.1. Le pourcentage de cellules marquées par l'AcM F4 chez la souris NZB est comparable au pourcentage de cellules réagissant avec cet AcM chez la souris BALB/c. Ces résultats démontrent donc la présence d'une molécule apparentée à l'antigène NK2.1 chez la souris NZB.

7.2 Radioimmunoprécipitation

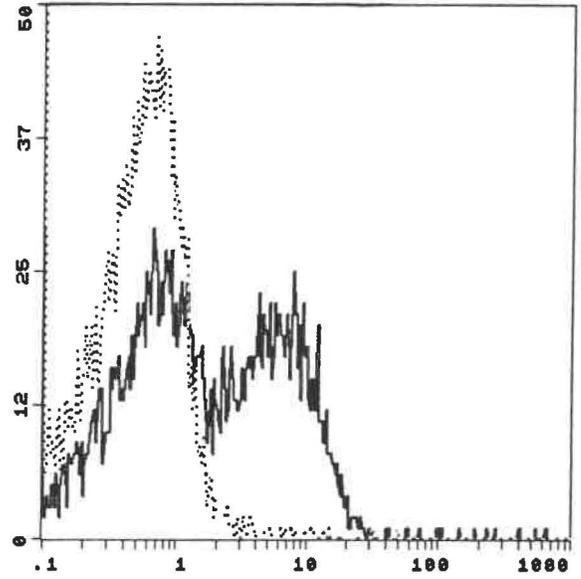
La présence d'une molécule réagissant avec l'AcM F4 chez NZB a été confirmée par radioimmunoprécipitation (Fig. 10). La bande d'environ 70 kDa retrouvée dans certains puits est considérée non-spécifique, puisqu'elle est retrouvée avec le réactif contrôle. En conditions non-réductrices (A), une bande d'environ 124 kDa est obtenue. L'immunoprécipitation d'une bande

FIGURE 9 Analyse cytofluorométrique de la réactivité des AcM A5 et F4 avec les cellules spléniques enrichies en cellules NK de la souris NZB

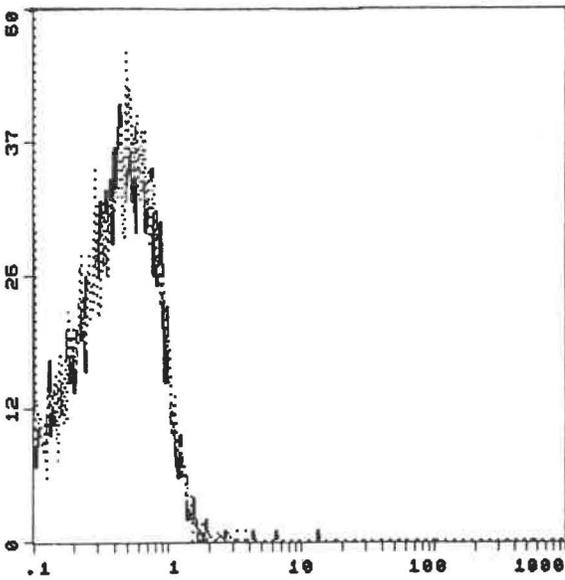
Les histogrammes représentent le nombre relatif de cellules (ordonnée) en fonction de l'intensité de fluorescence, exprimée sur une échelle logarithmique (abscisse). Pour les marquages, 0,5 µg de l'AcM 4LO3311-biotine, 4,5 µg de l'AcM F4-biotine, 16 ng de l'AcM A5-biotine et 2,5 µg de l'AcM PK136-biotine ont été utilisés (traits pleins). Le trait pointillé correspond au profil observé après incubation avec les anticorps contrôles : IgG3 et IgG2a de souris et IgG de hamster, tous conjugués à la biotine.



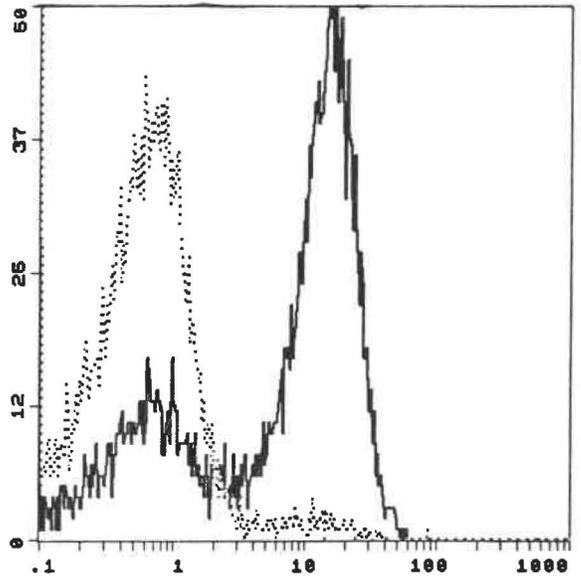
4LO331



F4



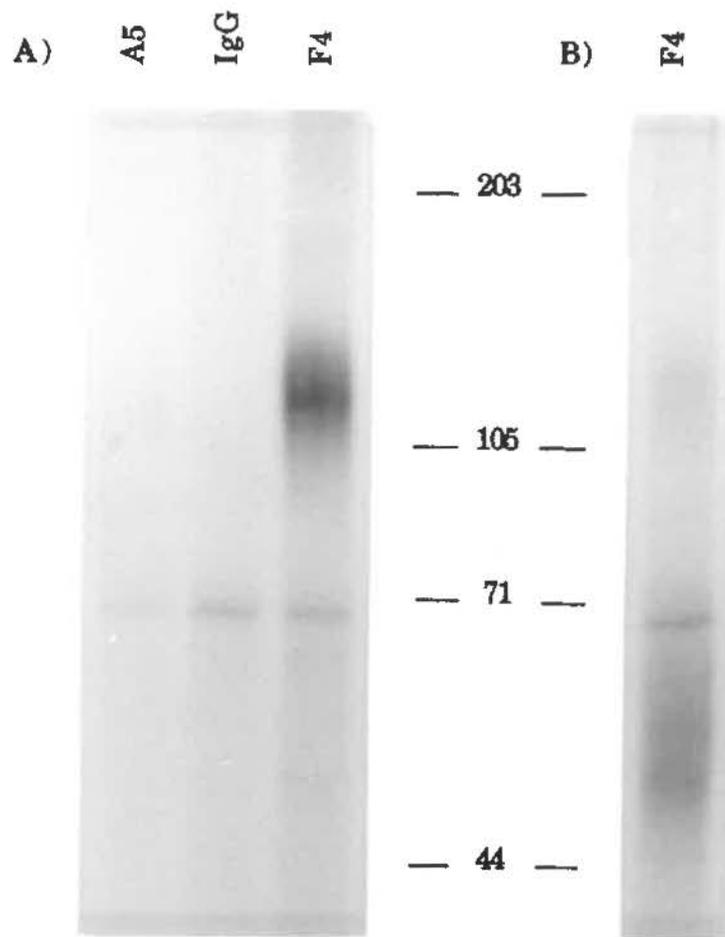
A5



NK1.1 (PK136)

FIGURE 10 Radioimmunoprécipitation avec les AcM anti-NK2, d'un lysat de cellules spléniques enrichies en cellules NK de la souris NZB

L'anticorps contrôle est une IgG de hamster utilisée à 50 µg pour 1 x 10⁷ cellules. Les échantillons ont été traités en condition non réductrices (en A) et réductrices (en B).



avec un poids moléculaire très différent du NK2 (130 kDa) aurait pu signifier que l'AcM F4 avait une réactivité croisée avec une molécule présente sur les cellules NK de NZB. En conditions réductrices (B), mis à part la bande non spécifique, deux bandes d'environ 52 et 58 kDa sont retrouvées. La protéine présente chez NZB pourrait donc être un hétérodimère. La réaction de réduction n'est pas complète, ce qui suggère que les deux sous-unités sont fortement attachées par des ponts disulfures. Dans une des expériences d'immunoprécipitation d'un lysat de cellules spléniques de C57BL/6 enrichies en cellules NK, nous avons aussi retrouvé la présence de deux bandes en conditions réductrices, obtenues avec l'AcM F4 (résultats non illustrés).

8. INFLUENCE DES ANTIGÈNES DE CLASSE I DU CMH SUR L'EXPRESSION DE L'ANTIGÈNE NK2

Comme le suggèrent les résultats rapportés par Gosselin *et al.*, (manuscrit soumis) et ceux présentés à la figure 5, il semble y avoir une relation entre l'haplotype du CMH des souris et le niveau d'expression de l'antigène NK2. Des travaux mesurant la réactivité de l'AcM 4LO3311 avec des cellules NK de souris congéniques et congéniques recombinantes, qui ne diffèrent entre elles que par une portion du chromosome 17 incluant les gènes H-2, ont en effet permis de démontrer que l'expression de l'antigène NK2.1 est influencée par des gènes associés au CMH. Il était dès lors intéressant de vérifier si les résultats obtenus avec l'AcM 4LO3311 se confirmeraient avec les AcM A5 et F4.

Tel que rapporté dans le manuscrit précité, les résultats présentés à la figure 5 démontrent que le niveau d'expression (IMF) de l'antigène NK2.1 décelé par l'AcM 4LO3311 est augmenté chez les souris B10.D2 (H-2^d), mais reste inchangé chez les souris B10.BR (H-2^k), et ce, par rapport aux souris C57BL/10 (H-2^b) dont dérivent ces souris congéniques (Fig. 11 et Tableau IV). Cette variation dans le niveau d'expression semble se vérifier avec l'AcM F4 bien qu'elle soit beaucoup moins évidente (Fig. 11), possiblement à cause de la faible affinité de cet AcM pour l'antigène NK2. L'AcM A5, quant à lui, ne met en évidence aucune variation dans le niveau d'expression de l'antigène NK2, comme l'indiquent les profils d'expression et les IMF semblables pour les trois souches de souris (Fig. 11 et Tableau IV). Les IMF et les pourcentages de cellules positives ne sont pas indiqués pour l'AcM F4 dans le tableau IV, étant donné les difficultés rencontrées pour définir cette population, qui se superpose à la fluorescence de base.

Les résultats de la modulation de l'expression de l'antigène NK2.1 décelé par l'AcM 4LO3311 sur les cellules NK de souches de souris congéniques sur fond B10 portant un segment chromosomique dérivé de la souris A (Figure 11 et tableau IV) sont aussi conformes aux résultats rapportés par Gosselin *et al.* (manuscrit soumis). En effet, chez les souris B10.A(2R) (kkk/b), le niveau d'expression de l'antigène NK2 est augmenté par rapport aux souris C57BL/10 (bbbb), mais pas autant que chez les souris B10.A (kkk/d). Chez les souris B10.A(5R) (bb/kd), le niveau d'expression est semblable à celui des souris C57BL/10. Encore ici les résultats obtenus avec l'AcM F4 sembleraient suggérer les mêmes variations, bien que de façon plus atténuée, mais aucune variation significative dans le niveau

**FIGURE 11 Analyse de la modulation par le CMH de l'expression de
l'antigène NK2**

Les histogrammes représentent le nombre relatif de cellules (ordonnée) en fonction de l'intensité de fluorescence, exprimée sur une échelle logarithmique (abscisse). Les traits pleins représentent le profil observé après incubation avec les AcM conjugués à la biotine : 32 ng d'AcM A5, 3,6 µg d'AcM F4 et 1 µg d'AcM 4LO3311 ont été utilisés. Les anticorps contrôles (traits pointillés) sont une IgG de hamster (AcM B-2A10) et une IgG3 de souris (voir résultats, section 3) conjuguées à la biotine.

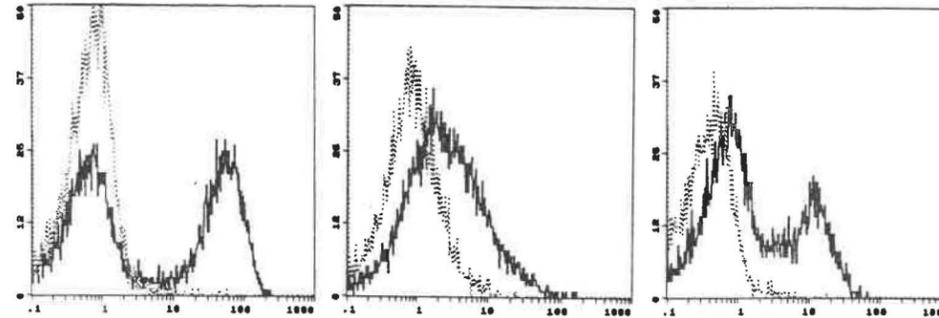
CMH Classe
I II II I
 K A E D

A5

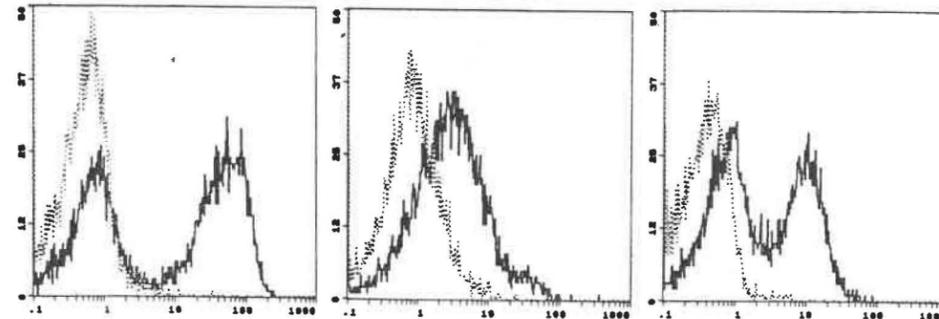
F4

4LO3311

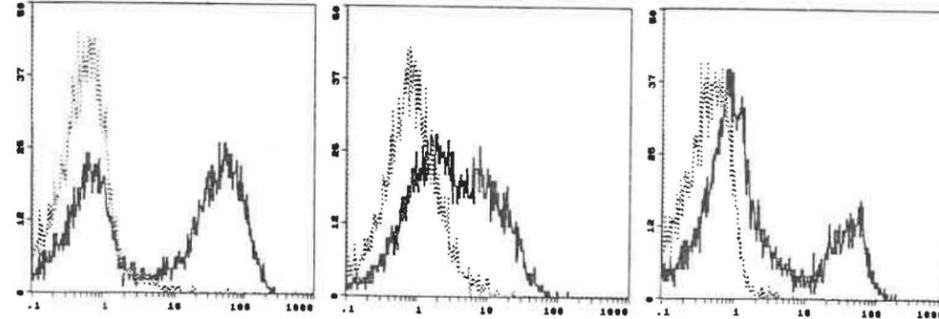
C57BL/10
 b b b b



B10.BR
 k k k k



B10.D2
 d d d d



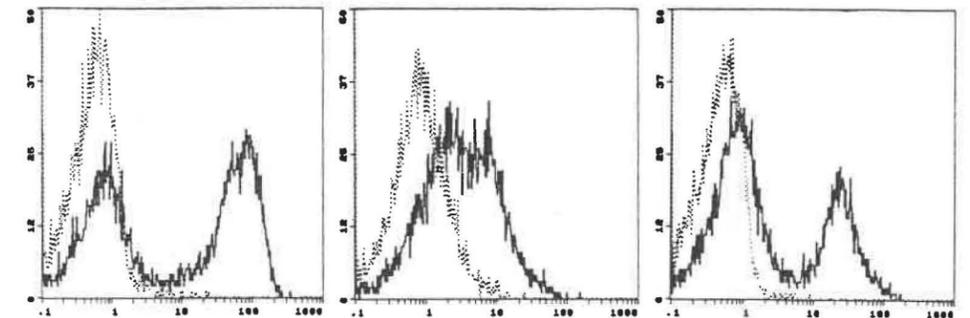
CMH Classe
I II II I
 K A E D

A5

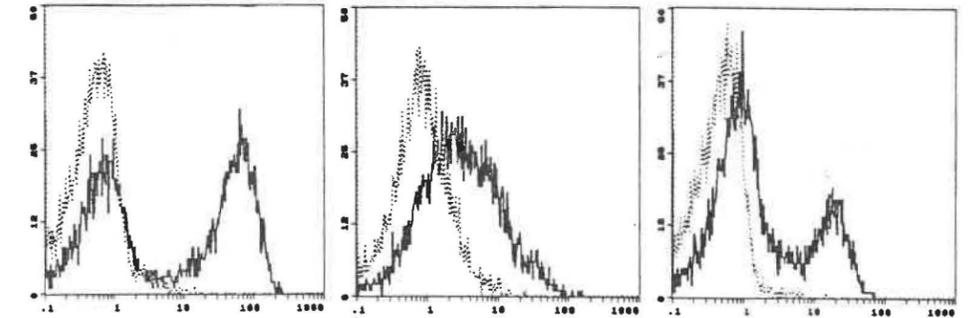
F4

4LO3311

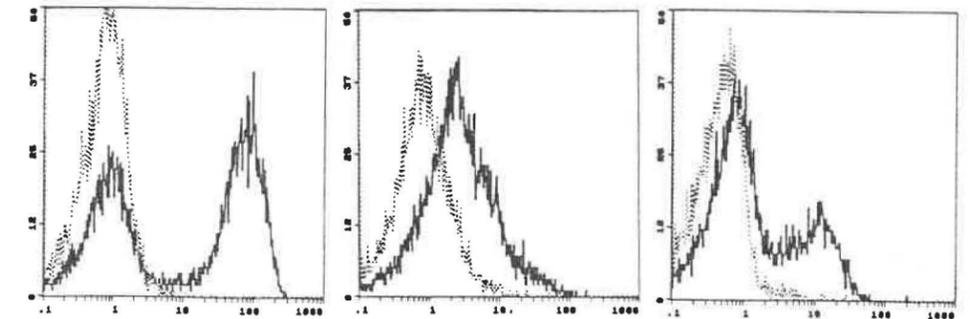
B10.A
 k k k / d



B10.A(2R)
 k k k / b



B10.A(5R)
 b b / k d



**TABLEAU IV. RÉACTIVITÉ DES CELLULES SPLÉNIQUES ENRI-
CHIES EN CELLULES NK DE SOURIS CONGÉNIQUES
ET CONGÉNIQUES RECOMBINANTES, AVEC
DIFFÉRENTS AcM ANTI-NK2^a**

Souris	allèles du H-2 pour les loci K A E D	A5		4LO3311	
		% de cellules positives ^b	IMF ^c	% de cellules positives	IMF
C57BL/10	b b b b	42 ± 4	51 ± 13	30 ± 6	11 ± 1
B10.BR	k k k k	51 ± 3	39 ± 9	40 ± 4	9 ± 2
B10.D2	d d d d	52 ± 3	47 ± 6	23 ± 3	41 ± 1
B10.A	k k k/d	47 ± 7	53 ± 12	24 ± 6	31 ± 8
B10.A(2R)	k k k/b	48 ± 4	49 ± 13	25 ± 3	25 ± 6
B10.A(5R)	b b/k d	47 ± 10	60 ± 19	33 ± 6	16 ± 4

- a** Les cellules spléniques enrichies en cellules NK ont été incubées avec chaque AcM anti-NK2 conjugué à la biotine puis avec le conjugué SA-PE. Les analyses de cytométrie en flux ont été effectuées tel que décrit dans matériel et méthodes. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type de trois expériences.
- b** Représente la fraction de cellules réagissant avec l'AcM donné.
- c** IMF : l'intensité moyenne de fluorescence de la population de cellules positives.

d'expression de l'antigène NK2 n'est détectée par l'AcM A5. Il est à noter que l'AcM A5 réagit avec un plus grand nombre de cellules que l'AcM 4LO3311 chez la souris C57BL/10, tout comme c'était le cas chez la souris C57BL/6.

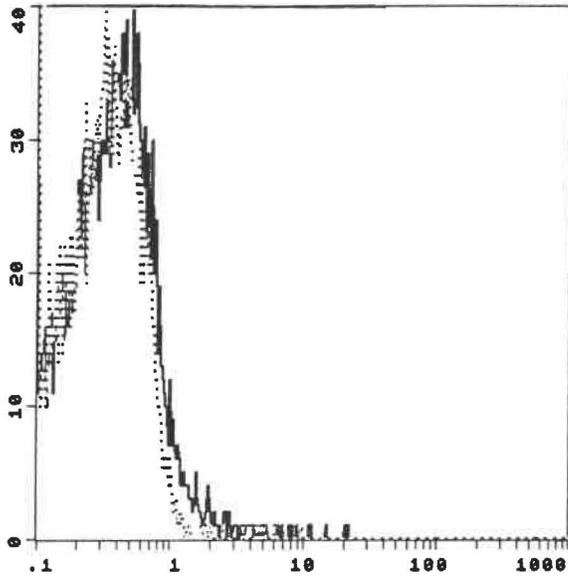
9. RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 AVEC LES CELLULES NK DE RAT

Quelques molécules spécifiques des cellules NK murines, comme le NKR-P1, sont présentes avec un certain degré d'homologie chez d'autres espèces, comme le rat ou l'humain. Il était donc raisonnable de suspecter la présence d'un homologue du NK2 chez le rat. L'AcM 4LO3311 a été produit à la suite de l'immunisation d'une souris 129 avec les cellules NK de la souris C57BL/6, c'est-à-dire suite à une alloimmunisation. Cet AcM reconnaît donc très vraisemblablement un alloantigène et ne permet pas de rechercher une forme du NK2 chez une autre espèce. Par contre, les AcM A5 et F4 ayant été produits chez le hamster, ils pourraient détecter un épitope invariant commun à des antigènes homologues d'espèces différentes. Le candidat le plus probable est l'AcM F4, puisqu'il détecte un épitope exprimé par les cellules NK de toutes les souches de souris testées jusqu'à maintenant.

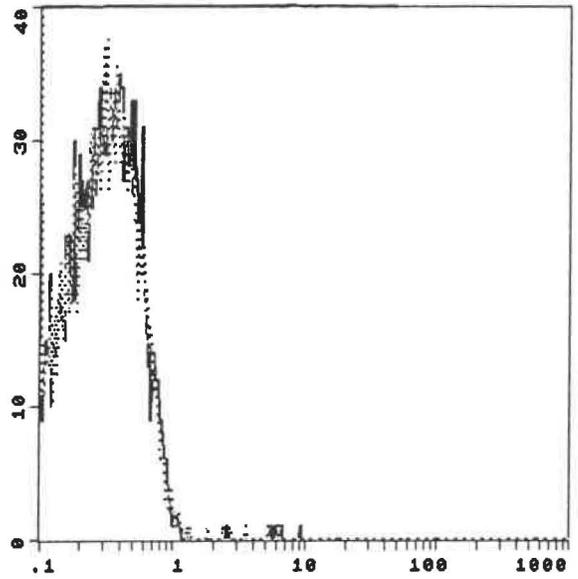
Les résultats de la réactivité des AcM anti-NK2 sur les cellules spléniques de rat ayant subi deux passages sur laine de nylon sont illustrés à la figure 12. Comme prévu, l'AcM 4LO3311 ne réagit pas avec les cellules de rat, mais les AcM xénogéniques A5 et F4 non plus. Le seul AcM qui ait

FIGURE 12 Réactivité des AcM A5 et F4 avec les cellules NK de rat

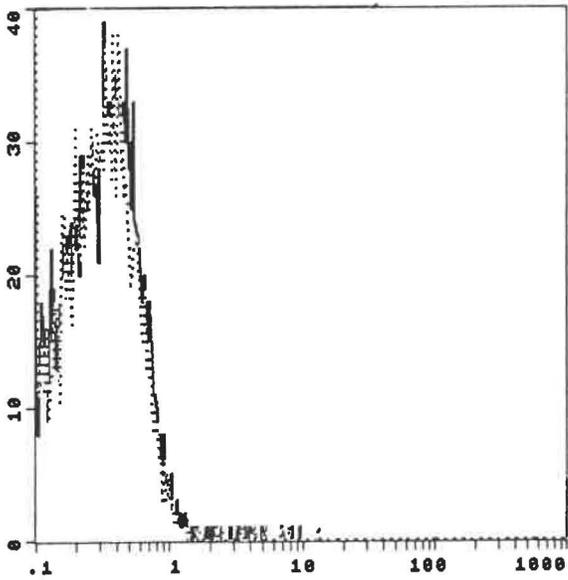
Les histogrammes représentent le nombre relatif de cellules (ordonnée) en fonction de l'intensité de fluorescence, exprimée sur une échelle logarithmique (abscisse). Les cellules spléniques de deux rats ont été passées sur deux colonnes de laine de nylon, tel que décrit dans la section 3 de matériel et méthodes. Les cellules non adhérentes ont été marquées avec les AcM conjugués à la biotine (traits pleins) : 1 μg d'AcM 4LO3311, 2 μg d'AcM 4LO439, 32 ng d'AcM A5 et 3,5 μg d'AcM F4 ont été utilisés. Les anticorps contrôles (traits pointillés) sont une IgG de hamster (AcM B-2A10) et une IgG3 de souris conjuguées à la biotine.



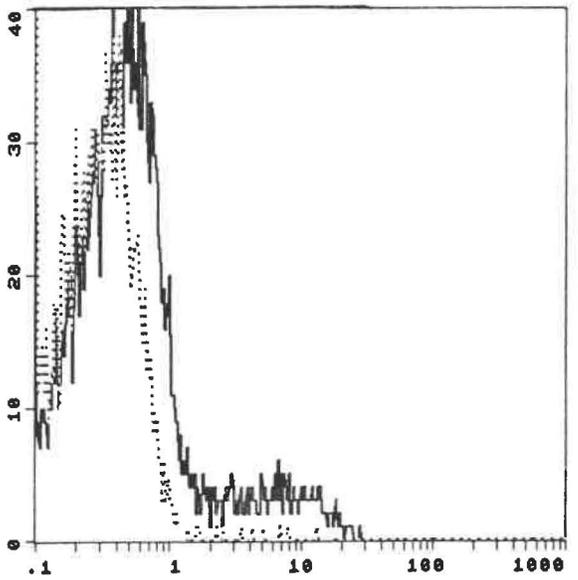
F4



A5



4LO3311



4LO439

réagit avec les cellules de rat est l'AcM 4LO439. Cet AcM a été produit dans notre laboratoire et détecte un antigène spécifique aux cellules NK de la souris C57BL/6. Environ 10 % des cellules de rat réagissent avec l'AcM 4LO439, ce qui correspond au pourcentage habituel de cellules NK obtenu après deux passages des cellules spléniques sur laine de nylon. L'AcM 4LO439 ne fait toutefois pas partie des études présentées dans ce mémoire.

**10. EFFET DES AcM A5 ET F4 ET DES FRAGMENTS F(ab')₂
CORRESPONDANTS SUR LA CYTOTOXICITÉ DES CELLULES
LAK DE BALB/c ENVERS LA CELLULE TUMORALE P815**

Des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré que l'antigène NK2.1 est un antigène activateur de la cytotoxicité des cellules NK (Morelli et Lemieux, 1993). Cette propriété de l'antigène NK2.1 a été démontrée par la stimulation des cellules effectrices (NK ou LAK) par l'AcM 4LO3311 entier, et aussi par ses fragments F(ab')₂ et F(ab). Il était donc intéressant de vérifier si les AcM A5 et F4 possédaient le même potentiel activateur de la cytotoxicité.

Les cellules LAK de la souris BALB/c ont été utilisées, puisque les cellules de cette souche de souris sont celles qui présentent la plus forte expression de l'antigène NK2, et aussi parce que l'utilisation de cellules LAK est plus économique que l'utilisation de cellules NK fraîches dans les tests de cytotoxicité. Conséquemment au choix de l'utilisation de cellules LAK, la cellule cible P815 a été utilisée, plutôt que la lignée prototype YAC-1,

car les pourcentages de lyse sont trop élevés lorsque cette dernière est utilisée. Un autre avantage de l'utilisation de la cellule cible P815 est qu'elle rend possible, en raison de son expression d'un récepteur Fc, l'évaluation de la contribution apportée par le phénomène de lyse redirigée dans la lyse cellulaire. La réactivité des AcM A5 et F4 avec les cellules LAK de BALB/c a été confirmée par cytométrie en flux, avant la réalisation des expériences de cytotoxicité (résultats non illustrés).

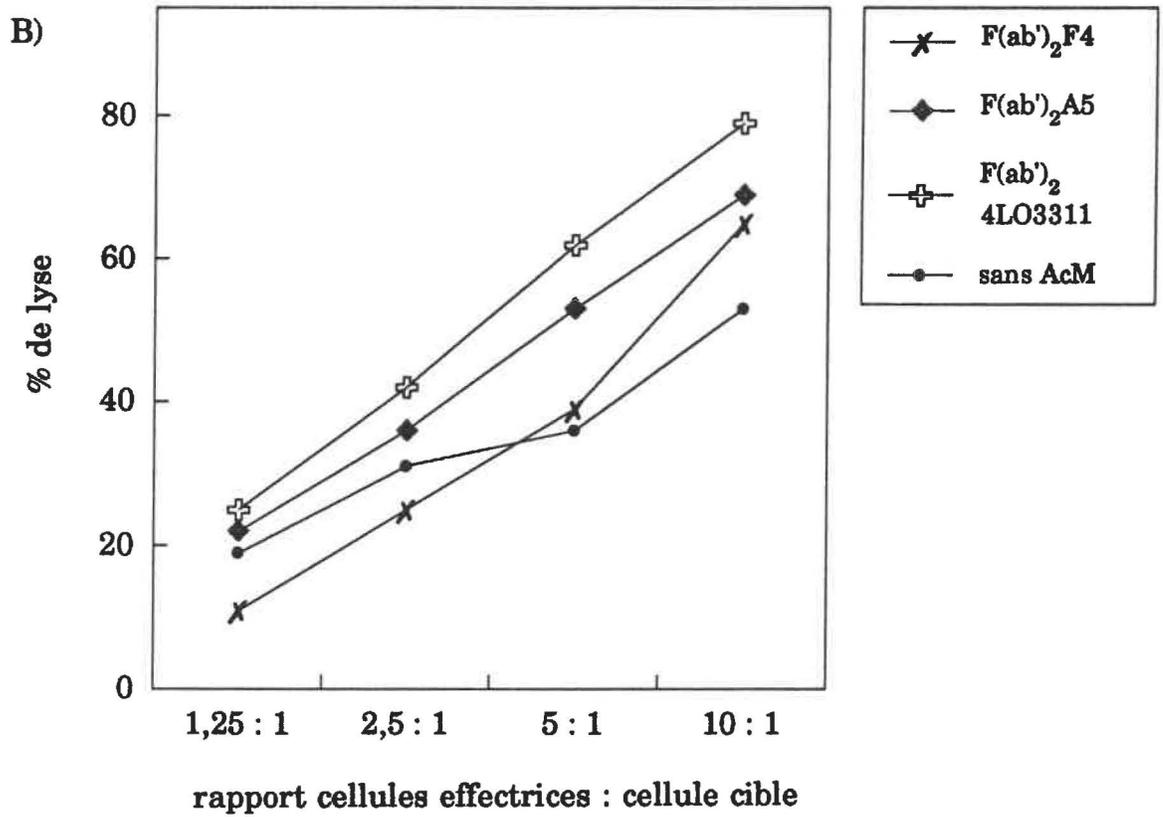
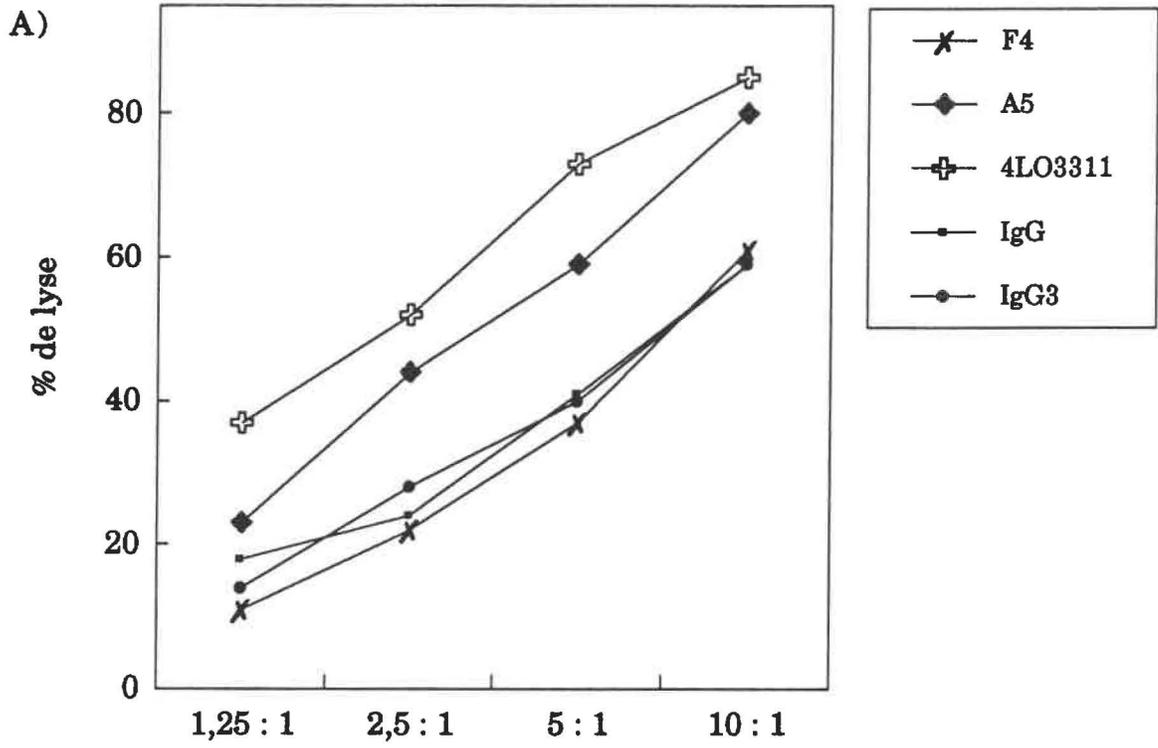
L'AcM A5 a un effet activateur de la lyse, mais à un degré moindre que l'AcM 4LO3311 (Fig. 13A). L'AcM F4 n'active pas la lyse de la cellule P815, puisque le niveau de lyse est du même ordre que celui obtenu avec les anticorps contrôles IgG3 de souris et IgG de hamster. Deux conclusions sont possibles : soit que l'AcM F4 reconnaît un épitope de l'antigène NK2 non-activateur, soit que la concentration d'anticorps ajoutée est insuffisante pour activer la lyse dans le cas de l'AcM F4.

Les fragments $F(ab')_2$ des AcM A5 ont un effet activateur de la lyse comme les fragments $F(ab')_2$ des AcM 4LO3311, mais leur effet est moindre (Fig. 13B), ce qui concorde avec les résultats obtenus avec les AcM entiers. L'effet activateur des AcM A5 et 4LO3311 est globalement moins important avec les fragments $F(ab')_2$ qu'avec les AcM entiers correspondants. Ceci pourrait être dû au fait qu'une partie de la cytotoxicité observée avec les AcM entiers provient du phénomène de lyse redirigée.

Les fragments $F(ab')_2$ de l'AcM F4 n'ont pas d'effet activateur de la lyse. Même si une légère inhibition de la lyse semble être obtenue aux plus

FIGURE 13 Effet des AcM A5 et F4 et des fragments F(ab')₂ correspondants sur la cytotoxicité des cellules LAK de BALB/c envers la cellule tumorale P815, en comparaison avec l'AcM 4LO3311

En A) est représentée la lyse des cellules P815 par les cellules LAK de BALB/c, en présence de 500 ng des AcM A5, F4 ou 4LO3311 ou de 500 ng des anticorps contrôles IgG3 de souris et IgG de hamster, et ce, pour tous les rapports cellules effectrices : cellule cible. En B) est représentée la lyse de la cellule P815 par les cellules LAK de BALB/c, en absence d'AcM ou en présence de 500 ng des fragments F(ab')₂ de A5, F4 ou 4LO3311. Les résultats d'une expérience représentative de trois qui ont été exécutées sont présentés.



faibles rapports cellules effectrices : cellule cible, cette inhibition ne s'est pas répétée de façon constante dans les trois expériences de cytotoxicité. Il en est de même pour la légère activation observée pour les rapports cellules effectrices : cellule cible élevés. Globalement, les fragments $F(ab')_2$ de l'AcM F4 ne provoquent pas d'augmentation de la lyse de la cellule P815.

DISCUSSION

1. PRODUCTION D'AcM XÉNOGÉNIQUES

Comme la plupart des réactifs disponibles dirigés contre les cellules NK murines ont une réactivité limitée à certaines souches de souris, à certaines formes alléliques, ou à certains membres d'une famille de molécules, notre intention était de produire des AcM anti-NK2 xénogéniques capables de détecter des épitopes non-polymorphiques et ayant la réactivité la plus large possible. Un objectif similaire avait été à l'origine de la production de l'AcM de rat 4D11 dirigé contre l'antigène murin LGL-1 (Mason *et al.*, 1988). L'établissement d'un bon protocole de fusion hamster-souris et la mise au point d'un test d'immunoblot hautement spécifique pour le criblage ont permis la sélection de deux hétérohybridomes stables sécrétant des AcM dirigés contre l'antigène NK2, les AcM A5 et F4. Il est intéressant de noter que bien que les hybridomes A5 et F4 proviennent d'un hamster immunisé avec des cellules LAK et qu'ils ont été sélectionnés à l'aide de l'antigène NK2.1 purifié à partir de ces mêmes cellules, ils réagissent autant avec les cellules NK non activées qu'avec les cellules LAK. Ceci nous permet de conclure qu'au moins certains épitopes de l'antigène NK2 ne subissent pas de changement de conformation suite à l'activation cellulaire. Avec l'AcM 4LO3311, nous disposons désormais de trois réactifs anti-NK2.

2. SPÉCIFICITÉ ÉPITOPIQUE DES AcM A5 ET F4

Les résultats des expériences de compétition démontrent clairement que les épitopes reconnus par les AcM A5 et 4LO3311 sont distincts et ne se chevauchent pas. Par ailleurs, la liaison de l'AcM F4 inhibe la liaison des AcM A5-FITC et 4LO3311-FITC, ce qui suggère que l'épitope reconnu par l'AcM F4 chevauche à la fois l'épitope reconnu par l'AcM A5 et celui reconnu par l'AcM 4LO3311. L'inhibition de la liaison des AcM A5-FITC et 4LO3311-FITC n'est pas complète, probablement parce que l'AcM F4 n'occupe pas tous ses sites de liaison. Ceci serait dû au fait que l'épitope reconnu par l'AcM F4 est peu accessible, comme le démontre la difficulté à obtenir une inhibition complète de la liaison de l'AcM F4 par lui-même. De façon contradictoire, la liaison des AcM A5 et 4LO3311 fait augmenter de façon spécifique la liaison de l'AcM F4-FITC. Une explication de ce phénomène serait que la liaison des AcM 4LO3311 ou A5 en premier lieu induit un changement de conformation de la molécule NK2, qui rend alors l'épitope reconnu par l'AcM F4 plus distinct et accessible. Une autre éventualité serait que l'épitope reconnu par l'AcM F4 soit rendu plus accessible par le dégagement, par la liaison des AcM A5 ou 4LO3311, d'une molécule associée à l'antigène NK2 qui dissimulerait le site de liaison de F4. Dans les deux cas, le fait que l'inhibition entre l'AcM F4 et les AcM A5 et 4LO3311 ne se produise pas dans les deux sens nous incite à croire que l'épitope reconnu par l'AcM F4 se situerait près des épitopes de A5 et 4LO3311, sans les chevaucher.

L'antigène NK2.1, tel que reconnu par l'AcM 4LO3311, est formé de deux sous-unités de 65 kDa, mais il n'a pas été possible d'établir de manière certaine s'il s'agissait d'un homodimère ou d'un hétérodimère (Gosselin *et al.*, 1993). Aussi, les possibilités suivantes existent-elles :

- 1) Les deux sous unités sont de séquence en acides aminés identiques et portent toutes deux l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311 (homodimère).
- 2) Les deux sous unités sont de séquence en acides aminés différentes, mais portent toutes deux l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311 (hétérodimère).
- 3) Les deux sous-unités sont de séquence en acides aminés différentes et une seule porte l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311 (hétérodimère).

Les résultats présentés dans ce mémoire permettent d'envisager ces même trois possibilités en ce qui concerne les spécificités épitopiques des AcM A5 et F4, sans toutefois nous permettre de déterminer exactement quel(s) cas existe(nt) en réalité dans une population de cellules NK donnée ou chez différentes souches de souris. La recherche de la séquence de l'épitope du NK2 reconnu par l'AcM A5 à l'aide d'une banque décapeptidique de phages, est présentement en cours en collaboration avec le laboratoire du Dr Rosemonde Mandeville.

3. RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 CHEZ LA SOURIS

3.1 Réactivité avec les cellules NK de différentes souches

Chez presque toutes les souches de souris étudiées, les trois AcM anti-NK2 détectent des sous-populations identiques quant au pourcentage de cellules positives, et, des différences dans le niveau d'expression de l'antigène NK2 à la surface cellulaire. Les résultats obtenus avec les AcM A5 et F4 confirment donc ceux préalablement obtenus avec l'AcM 4LO3311. En outre, selon les résultats de l'immunoprécipitation d'un lysat de cellules spléniques enrichies en cellules NK de la souris BALB/c, on peut penser que les différences entre les densités d'expression détectées par les trois AcM anti-NK2 proviennent de différences dans l'affinité des trois AcM, puisque la quantité de molécule précipitée par chacun des AcM semble équivalente.

Les résultats de cytométrie en flux obtenus avec la souris C57BL/6 sont particulièrement intéressants, puisque les trois AcM détectent des pourcentages différents de cellules positives. La présence d'un plus grand nombre de cellules réagissant avec l'AcM A5 qu'avec l'AcM 4LO3311, de concert avec les résultats d'immunoprécipitation, impliquent l'existence d'une population de cellules A5⁺4LO3311⁻ exprimant une protéine qui ne possède pas l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311. Le corollaire de cette observation serait qu'il existe au moins deux molécules NK2 différentes exprimées sur les cellules NK de C57BL/6, ce qui suggérerait l'existence d'une famille de molécules homologues. Une situation analogue a été rapportée pour un autre récepteur NK, des populations de cellules NK

simples positives Ly-49A⁺Ly-49C⁻ et Ly-49A⁻Ly-49C⁺ et de cellules doubles positives Ly-49A⁺Ly-49C⁺ ayant été identifiées chez la souris C57BL/6 (Brennan *et al.*, 1994). Dans notre cas, il n'est pas possible de déterminer si la population de cellules A5⁺4LO3311⁻ est en fait une population de cellules A5⁺4LO3311⁻F4⁺ ou de cellules A5⁺4LO3311⁻F4⁻, ou bien si elle comporte à la fois ces deux populations de cellules.

L'hétérogénéité dans l'expression des différents épitopes du NK2 sur les cellules NK d'une même souche de souris et entre les populations de cellules NK de différentes souches de souris pourrait être le reflet de différentes propriétés fonctionnelles des sous-populations de cellules NK. Comparativement, chez l'humain, il a été suggéré que les cellules exprimant les molécules Kp43 à une forte intensité, et non les cellules les exprimant à une intensité intermédiaire ou faible, seraient capables de transmettre un signal inhibiteur (Moretta *et al.*, 1994). Des différences fonctionnelles entre les cellules exprimant fortement ou faiblement l'antigène Ly-49A ont aussi été rapportées (Olsson *et al.*, 1995).

De façon intéressante, chez des souris de différents haplotypes H-2, l'intensité d'expression de l'antigène NK2 varie inversement de l'intensité d'expression de l'antigène Ly-49. En effet, l'intensité d'expression de l'antigène Ly-49 est plus élevée chez les souris H-2^b, et plus faible chez les souris H-2^k > H-2^d (Olsson *et al.*, 1995), alors que l'intensité d'expression de l'antigène NK2 est plus élevée chez les souris H-2^d > H-2^k et plus faible chez les souris H-2^b. Ceci suggère une complémentarité dans l'expression des

différents antigènes fonctionnels des cellules NK murines : dans ce cas-ci, il s'agit d'antigènes possédant des fonctions antagonistes.

3.2 Réactivité avec les cellules NK de NZB

Un des résultats les plus significatifs de ce mémoire est la détection d'une réactivité de l'AcM F4 avec les cellules NK de la souris NZB en cytométrie en flux et en immunoprécipitation. Différentes hypothèses peuvent expliquer cette réactivité de l'AcM F4, alors que les AcM 4LO3311 et A5 ne réagissent pas. La première à considérer serait que l'AcM F4 reconnaît chez cette souris la forme allélique de l'antigène NK2.1, l'antigène NK2.2 : le gène codant pour l'antigène NK2 serait donc dimorphique et toutes les souches de souris possèderaient ou le gène codant pour la forme NK2.1, ou le gène codant pour la forme NK2.2. L'AcM F4 reconnaîtrait obligatoirement une portion invariable commune aux deux formes alléliques NK2.1 et NK2.2, puisqu'il réagit aussi avec la forme NK2.1. Fait important, l'AcM de souris 4LO3311 et l'AcM de hamster A5 ne reconnaîtraient tous deux que la forme allélique NK2.1. Le fait que plus d'un AcM reconnaissent des épitopes distincts situés sur une même forme allélique, qui normalement ne possède qu'une différence de quelques acides aminés avec l'autre forme allélique, sous-entend que les différences entre les séquences en acides aminés du NK2.1 et du NK2.2 seraient relativement grandes. L'importance de ces différences, ajoutée aux résultats de cytométrie en flux et d'immunoprécipitation chez C57BL/6, suggèrent plutôt une hypothèse alternative, soit l'existence d'une famille de molécules apparentées dont les

séquences présenteraient de forts pourcentages d'homologie, qui pourraient même varier d'une souche de souris à l'autre (polymorphisme allélique). L'existence de variants alléliques de certaines des molécules Ly-49 chez d'autres souches de souris a d'ailleurs déjà été suggérée (Yokoyama et Seaman, 1993). De plus, l'antigène NK1.1, qui avait tout d'abord été considéré comme un alloantigène existant sous deux formes alléliques et donc comme le produit d'un gène dimorphique s'est plutôt avéré être codé par un membre d'une famille de gènes apparentés, soit le *NKR-P1C* (Ryan *et al.*, 1992). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que la molécule LGL-1, d'abord considérée comme une molécule non-polymorphique (Mason *et al.*, 1988), est en fait codée par un des membres de la famille de gènes *Ly-49*, le *Ly-49G2* (Mason *et al.*, 1995).

En outre, la présence d'un hétérodimère chez NZB suggère la présence d'au moins deux gènes codant pour le NK2 coexprimés dans les cellules NK de cette souche. L'association éventuelle en hétérodimères de différents membres des familles de molécules murines *NKR-P1* et *Ly-49* a été suggérée, considérant la grande homologie entre les molécules d'une même famille et la possibilité de l'expression de plus d'un membre de la famille *Ly-49* à la surface d'une même cellule (cellules *Ly-49A⁺Ly-49C⁺*) (Yokoyama et Seaman, 1993 ; Smith *et al.*, 1994 ; Brennan *et al.*, 1994). Toutefois, l'hétérodimère présent chez NZB pourrait aussi provenir de l'existence de modifications post-traductionnelles différentes pour les deux sous-unités. Ainsi, chez l'humain, les chaînes de 28 et 32 kDa du CD69 proviennent de la glycosylation différentielle d'un seul polypeptide de 22,5 kDa, et les deux

chaînes sont exprimées simultanément à la surface des cellules (Testi *et al.*, 1994 ; Gerosa *et al.*, 1991).

La grande majorité des antigènes fonctionnels des cellules NK murines identifiés à ce jour sont codés par les familles de gènes d'un même complexe, soit celle du Ly-49 (Ly-49A, 5E6, LGL-1) et celle du NKR-P1 (NK1.1) (Yokoyama *et al.*, 1991 ; Wong *et al.*, 1991 ; Ryan *et al.*, 1992 ; Brennan *et al.*, 1994 ; Mason *et al.*, 1995). À ce jour, le gène codant pour la molécule 2B4 est le seul qui n'ait pas été associé au complexe des gènes NK. Gosselin *et al.* (manuscrit soumis) ont observé récemment que le gène codant pour le NK2 se situe aussi sur le chromosome 6, en association avec ceux du complexe des gènes NK. De plus, l'antigène NK2.1 partage certaines propriétés structurales avec le NKR-P1 de rat et de souris et le Ly-49 murin (Gosselin *et al.*, 1993 ; Yokoyama et Seaman, 1993). Dans le contexte actuel, une organisation des gènes du NK2 semblable à celle des familles de gènes du Ly-49 et du NKR-P1 est donc envisageable, qu'ils fassent partie de ces familles ou qu'ils constituent une nouvelle famille encore non identifiée.

La grande majorité des produits des gènes *Ly-49* ne sont pas encore caractérisés au point de vue moléculaire et il n'existe pas encore de réactifs sérologiques permettant de les identifier. Il serait donc possible que les gènes du NK2 fassent partie de la famille de gènes *Ly-49*, malgré les fonctions apparemment antagonistes des molécules *Ly-49* et NK2. De plus, bien que le *Ly-49A* soit d'un poids moléculaire de 85 kDa et le NK2.1 d'un poids moléculaire de 130 kDa, les deux protéines sont formées de deux sous-unités de 32 kDa lorsque déglycosylées (Yokoyama *et al.*, 1990 ; Gosselin *et al.*, 1993).

Toutefois, la séquence partielle en acides aminés de la portion N-terminale du NK2.1 obtenue par notre laboratoire n'a pratiquement pas d'homologie avec les séquences en acides aminés prédites des molécules de la famille Ly-49, qui présentent entre elles de 80 à 90 % d'homologie dans cette région (Sentman *et al.*, 1991 ; Smith *et al.*, 1994). L'appartenance de l'antigène NK2 à la famille des gènes du NKR-P1 serait plus probable, puisqu'il existe 40 % d'homologie entre la séquence de la portion N-terminale du NK2.1 et la séquence prédite de cette région du NK1.1 (NKR-P1C) (Ryan *et al.*, 1992 ; Gosselin, 1995). Toutefois, les transcrits des gènes de la famille du NKR-P1 sont absents ou retrouvés en très faible quantité chez la souris BALB/c ainsi que chez d'autres souches de souris chez qui l'antigène NK2 est pourtant exprimé (Giorda *et al.*, 1992). Si les gènes NK2 codant pour les molécules reconnues par les AcM 4LO3311, A5 et F4 font partie de la famille des gènes NKR-P1, ils correspondraient vraisemblablement à des gènes non encore identifiés. Puisque les homologues murins des gènes NKG2 humains n'ont pas encore été identifiés, il pourrait aussi être possible que les gènes du NK2 soient ces homologues.

Le fait que l'épitope reconnu par l'AcM F4 se retrouve sur les cellules NK de la souris NZB, en absence des épitopes reconnus par les AcM A5 et 4LO3311, confirme que ces trois épitopes sont distincts, malgré ce que suggéraient certains résultats des expériences de compétition.

4. PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES ÉPITOPES RECONNUS PAR LES AcM A5 ET F4

Le fait que l'AcM A5 et l'AcM 4LO3311 activent tous deux la lyse de la cellule P815 par les cellules LAK de BALB/c et le fait que les épitopes reconnus par ces deux AcM soient distincts suggèrent que plus d'un épitope de l'antigène NK2 est activateur. Ceci suggère conséquemment que plus d'un ligand activateur de l'antigène NK2 puisse exister, ce qui concorde avec la grande variété de cibles que peuvent lyser les cellules NK.

De plus, le fait que l'AcM F4 reconnaisse un épitope non activateur du NK2 est en accord avec le fait qu'il semble reconnaître un épitope non polymorphique, c'est-à-dire présent chez toutes les souches de souris testées, dont les souris qui ne possèdent pas l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311. En effet, il est logique de penser que les épitopes polymorphiques sont responsables de la spécificité et de la diversité de reconnaissance des cellules cibles, puisque le fait qu'un épitope non polymorphique possède une fonction activatrice ou inhibitrice réduirait de beaucoup la diversité clonale des cellules NK.

5. RÉACTIVITÉ DES AcM A5 ET F4 CHEZ LE RAT

L'absence de réactivité de l'AcM A5 avec les cellules NK de rat et le fait qu'il ne réagit que chez certaines souches de souris suggèrent que cet AcM détecte un épitope polymorphique. L'AcM F4, bien que détectant un épitope qui semble non polymorphique, reconnaîtrait une spécificité présente

uniquement chez la souris. Il n'est toutefois pas possible de conclure qu'il n'existe pas d'homologues du NK2 chez le rat, seulement à partir de l'absence de réactivité des AcM A5 et F4.

6. INFLUENCE DES ANTIGÈNES DE CLASSE I DU CMH

Karlhofer *et al.* (1994) ont émis l'hypothèse que l'expression *in vivo* du récepteur Ly-49A, dont les ligands seraient des molécules de classe I, est régulée spécifiquement par des interactions extracellulaires avec les molécules de classe I propres à l'hôte. Dans le même ordre d'idée et selon les résultats obtenus par Gosselin *et al.* (manuscrit soumis) avec l'AcM 4LO3311, une modulation de l'expression de l'antigène NK2.1 par les molécules de classe I exprimées par l'hôte serait envisageable. En effet, la faible expression de l'antigène NK2.1 chez les souris C57BL/10 (H-2K^b, H-2D^b), et B10.A(5R) (H-2K^b, H-2D^d) nous permettrait de suggérer une interaction avec la molécule K^b de l'hôte, qui causerait une régulation à la baisse de l'expression de l'antigène NK2. Le faible niveau d'expression noté chez les souris B10.BR (H-2K^k, H-2D^k) comparativement aux souris B10.A (H-2K^k, H-2D^d) suggèreraient par ailleurs une interaction avec la molécule D^k, avec le même effet. Toutefois, si les résultats avec l'AcM F4 semblent supporter cette interprétation, les résultats avec l'AcM A5 ne permettent pas de suspecter une modulation de l'expression de l'antigène NK2 par aucune des molécules de classe I de l'hôte étudiées, soit les haplotypes b, k et d des loci H-2D et H-2K.

Ce cas ressemble étrangement à celui de l'antigène Ly-49A. En effet, les résultats de l'équipe de Karlhofer *et al.* (1994) obtenus avec l'AcM A1, qui démontrent que l'expression des molécules H-2D^d ou D^k par l'hôte réduit considérablement l'expression du Ly-49A, n'ont pas été corroborés en utilisant d'autres AcM qui reconnaissent d'autres épitopes du Ly-49A, soient les AcM YE1/32 et YE1/48 (Brennan *et al.*, 1994). Les auteurs ont suggéré que les AcM YE1/32 et YE1/48 reconnaissent un épitope qui n'est pas sélectionné négativement par les haplotypes H-2^d ou H-2^k, à la différence de l'épitope reconnu par l'AcM A1. Dans le même ordre d'idée, la molécule NK2 portant l'épitope reconnu par l'AcM A5 pourrait ne pas être sélectionné négativement par les molécules K^b et D^k, contrairement à la molécule portant l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311. Ceci pourrait être rendu possible par l'existence d'une(de) molécule(s) homologue(s) NK2 exprimant particulièrement l'épitope reconnu par l'AcM A5. Les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent l'existence d'une(de) telle(s) molécule(s) chez la souris C57BL/6 et la souris C57BL/10, qui pourrait(ent) donc aussi être présente(s) chez les souris congéniques dérivant de C57BL/10 utilisées dans nos études.

Si seuls les résultats obtenus avec l'AcM 4LO3311 et F4 semblent suggérer que l'expression de l'antigène NK2 est modulée par certaines molécules de classe I exprimées par l'hôte, les résultats obtenus avec les trois AcM anti-NK2 démontrent tous que des facteurs indépendants des molécules de classe I participent aussi à cette modulation. En effet, le niveau d'expression de l'antigène NK2 de la souris B10.D2, qui possède le complexe H-2 de DBA/2 sur un fond B10, n'atteint pas celui de la souris DBA/2. De

même, les souris C57BL/6 et LP, qui sont toutes deux d'haplotype H-2^b, et les souris BALB/c et DBA/2, qui sont toutes deux d'haplotype H-2^d, possèdent des profils d'expression différents de l'antigène NK2.

Le fait que l'antigène NK2 pourrait interagir avec des molécules de classe I (selon les résultats obtenus avec les AcM 4LO3311 et F4), suggère qu'en plus des fonctions activatrices qui lui sont déjà connues (Morelli et Lemieux, 1993), il posséderait des fonctions inhibitrices à l'instar des autres récepteurs NK liant des molécules de classe I (Karlhofer *et al.*, 1992; Moretta *et al.*, 1993 ; Moretta *et al.*, 1994 ; Litwin *et al.*, 1994). Cette situation semble paradoxale, mais une contradiction analogue a déjà été notée dans le cas de la molécule humaine Kp43, pour laquelle une fonction activatrice (Aramburu *et al.*, 1991) et une fonction inhibitrice (Moretta *et al.*, 1994) ont été observées. Il a toutefois été suggéré que l'effet activateur de l'AcM anti-Kp43 observé par l'équipe d'Aramburu serait en fait le résultat d'une inhibition de l'inhibition de la lyse par l'interférence de la réaction entre Kp43 et son ligand HLA-B7 (Moretta *et al.*, 1994). Dans le même ordre d'idée, il serait donc possible que les épitopes activateurs reconnus par les AcM 4LO3311 et A5 soient en fait des épitopes inhibiteurs. Cette hypothèse est toutefois peu probable puisqu'il a été établi qu'en absence d'interaction avec un ligand cellulaire éventuel, l'AcM 4LO3311 immobilisé dans des plateaux de culture est capable d'amorcer la transduction d'un signal activateur se traduisant par l'exocytose granulaire (Morelli et Lemieux, 1993). La capacité de l'AcM A5 à provoquer l'exocytose granulaire reste à déterminer. La détection d'un éventuel épitope inhibiteur de la molécule NK2 nécessiterait

probablement l'utilisation d'AcM anti-NK2 détectant des épitopes différents de ceux reconnus par les AcM que nous possédons actuellement.

7. MODÈLE HYPOTHÉTIQUE D'ORGANISATION DES MOLÉCULES NK2

Le modèle présenté à la figure 14 représente une famille **hypothétique** de molécules NK2 apparentées expliquant les résultats obtenus avec les souches de souris BALB/c, C57BL/6 et NZB, mais illustrant également la possible complexité organisationnelle d'une telle famille. Les points suivants ont été pris en compte dans l'établissement de ce modèle :

- 1) Les deux AcM de hamster reconnaissent la molécule isolée de la souris BALB/c à l'aide de l'AcM 4LO3311.
- 2) Des proportions égales de molécules sont précipitées avec les trois AcM anti-NK2 à partir d'un lysat de cellules NK de BALB/c.
- 3) Une sous-population de cellules NK de C57BL/6 est A5⁺4LO3311⁻, et pourrait être une population de cellules A5⁺4LO3311-F4⁺ ou de cellules A5⁺4LO3311-F4⁻, ou bien comporter ces deux populations à la fois.
- 4) À partir d'un lysat de cellules NK de C57BL/6, une plus grande quantité de molécules est précipitée avec l'AcM A5 qu'avec les AcM F4 et 4LO3311, et les AcM 4LO3311 et F4 semblent précipiter des quantités de molécules à peu près équivalentes.

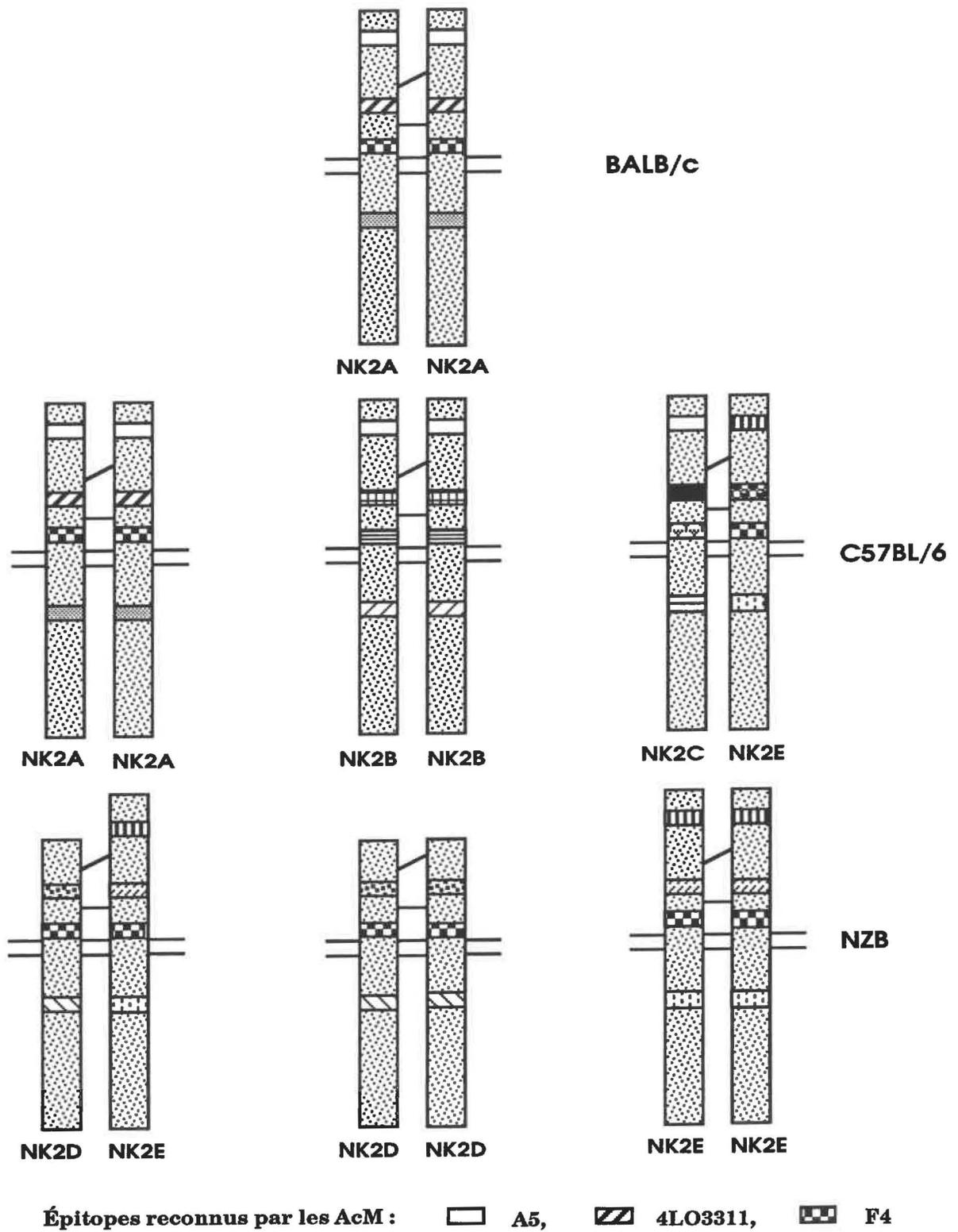


FIGURE 14 Modèle hypothétique d'organisation des molécules NK2

- 5) Un hétérodimère formé de sous-unités de poids moléculaire différents et reconnu uniquement par l'AcM F4 est présent chez la souris NZB.
- 6) La présence d'hétérodimères chez d'autres souches de souris que la souris NZB n'est pas exclue.

Les molécules NK2 représentées à la figure 14 (NK2A, NK2B, NK2C, NK2D et NK2E) proviendraient de l'expression de cinq gènes homologues appartenant à la famille NK2, soit les gènes *NK2A*, *NK2B*, *NK2C*, *NK2D* et *NK2E*. Les pourcentages d'homologie entre les cinq polypeptides codés par les gènes seraient relativement élevés. Il faut noter qu'il est possible que ces gènes, et donc les molécules codées par eux, soient polymorphiques et que des variations de séquence existent pour une même molécule de la famille NK2 chez différentes souches de souris. Les molécules NK2 sont représentées en tant que protéines transmembranaires formées de deux sous-unités reliées par des ponts disulfures. Bien que la molécule NK2 soit hautement glycosylée, les sites de glycosylation ne sont pas indiqués, puisqu'aucun élément de nos résultats ne peut suggérer une localisation. Les zones en pointillé représentent des portions conservées entre toutes les molécules NK2. Les zones à motifs représentent des différences de séquences entre les molécules NK2, ou des zones hypothétiques de polymorphisme, ou les deux à la fois. Les zones à motifs représentant les épitopes reconnus par les AcM A5, F4 et 4LO3311 sont indiquées dans la légende. La zone correspondant à l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311, bien que pouvant varier d'une molécule NK2 à l'autre, est possiblement polymorphique puisque que cet AcM a été produit suite à une alloimmunisation.

Conséquemment, le motif correspondant à cette zone sur la molécule NK2E a été représenté différemment chez NZB et C57BL/6. Bien que l'AcM A5 semble reconnaître un épitope polymorphique, puisqu'il n'est pas présent chez toutes les souches de souris, il est impossible d'en être certain puisque l'AcM A5 a été produit suite à une xénoimmunisation. La zone correspondant à l'épitope reconnu par l'AcM A5 sur la molécule NK2E a donc été considérée comme une différence de séquence d'avec les autres molécules NK2, mais qui reste la même chez toutes les souches de souris. L'épitope reconnu par l'AcM F4, quant à lui, semble non polymorphique, puisqu'il est présent chez toutes les souches de souris testées jusqu'à maintenant. Toutefois, la possibilité que la séquence de la zone correspondant à cet épitope varie d'une molécule NK2 à l'autre n'est pas écartée et est représentée dans le modèle. Les emplacements choisis pour les épitopes des AcM anti-NK2 sont arbitraires, étant donné que les molécules sont représentées sous forme linéaire et que les épitopes dépendent fort probablement de la structure tridimensionnelle de celles-ci. Toutefois, l'épitope reconnu par l'AcM F4 a été placé près de la membrane cytoplasmique, pour traduire le fait qu'il semble moins accessible que les autres. Le fait que l'AcM A5 ne permet pas de détecter des variations dans le niveau d'expression de l'antigène NK2 chez différentes souris congéniques et congéniques recombinantes n'a pas été pris en compte dans l'établissement de ce modèle.

Le modèle présenté vérifie bien les six points présentés au début de cette section. Plusieurs molécules différentes pourraient toutefois être présentes chez la souris BALB/c, en autant que la condition 2) est remplie. De même, d'autres homodimères ou hétérodimères pourraient aussi être

présents chez la souris C57BL/6, en autant que les conditions 3) et 4) sont remplies. Les homodimères NK2D-NK2D et NK2E-NK2E, bien qu'existant selon notre modèle chez la souris NZB, n'étaient pas détectés en conditions non réductrices. Ceci pourrait être dû à la largeur de la bande présente, qui pourrait empêcher la détection d'autres bandes, surtout que dans cette région du gel, les distances entre des protéines de poids moléculaires voisins sont petites. Il serait aussi possible que ces homodimères n'aient pas été détectés parce qu'il n'existent tout simplement pas. Des éléments de l'organisation des molécules NK2 chez NZB ainsi que chez les autres souches de souris étant vraisemblablement encore inconnus, l'établissement d'un modèle exact est impossible.

Le modèle présenté à la figure 14 ne tient pas compte d'une association possible des molécules NK2 avec un autre antigène de surface. L'hétérogénéité apparente de l'expression du NK2 dans les résultats présentés dans ce mémoire pourrait aussi être expliquée par l'existence de niveaux de glycosylation différents des molécules NK2 selon la souche de souris (non illustré dans ce modèle). En effet, des différences dans les niveaux de glycosylation des molécules 5E6 (Ly-49C), apparemment causés par des facteurs autres que la séquence primaire des molécules, ont été remarquées chez différentes souches de souris (Stoneman *et al.*, 1995). La réactivité d'un AcM anti-NK2 reconnaissant un épitope glycosylé serait donc affectée par l'existence de variations dans la glycosylation des molécules NK2. Nous n'avons pas établi si les AcM A5 et F4 reconnaissent ou non des épitopes glycosylés.

Il sera difficile de connaître de façon plus détaillée l'organisation réelle des gènes *NK2* tant que leur clonage ne sera pas effectué. Pour mener à bien ce projet, les AcM de hamster constituent un ajout précieux à l'outil que constituait déjà l'AcM 4LO3311. Nos trois AcM anti-NK2 sont des réactifs puissants pour l'étude de la distribution et des fonctions biologiques des molécules NK2. Ils seront d'autant plus utiles s'il s'avère que les produits de plusieurs gènes *NK2* sont coexprimés à la surface des cellules NK. En effet, une des difficultés dans l'étude des familles de gènes est l'absence de réactifs sérologiques permettant de différencier chacun des produits des gènes, comme c'est le cas actuellement pour les produits des gènes NKG2 humains et pour certains produits des gènes NKR-P1 et Ly-49 murins. La disponibilité de plusieurs AcM dirigés contre une même molécule, ou contre des homologues d'une même molécule, est très avantageuse puisque les différents épitopes reconnus pourront permettre d'explorer de façon plus poussée la ou les fonction(s) de ces molécules.

CONCLUSION

Le but de ce travail était d'étudier la distribution et les propriétés fonctionnelles de l'antigène NK2 à l'aide d'AcM xénogéniques. Deux hétérohybridomes hamster-souris sécrétant des AcM réagissant avec la molécule NK2 purifiée avec l'alloanticorps 4LO3311 ont été sélectionnés à l'aide de la technique d'immunoblot, soit les AcM A5 et F4. Malgré les différences apparentes d'affinité des AcM A5, F4 et 4LO3311 pour l'antigène NK2, tous trois confirment l'hétérogénéité des cellules NK en ce qui a trait à l'expression de l'antigène NK2 chez diverses souches de souris. Globalement, les résultats obtenus avec les trois AcM anti-NK2 suggèrent l'existence d'une famille de molécules NK2 homologues, que ces molécules fassent partie de familles déjà connues (Ly-49, NKR-P1) ou qu'elles constituent une famille encore non identifiée. L'hypothèse de l'existence d'une telle famille de molécules NK2 est supportée par : 1) la détection d'une population A5⁺4LO3311⁻ chez la souris C57BL/6, 2) la plus grande quantité de molécules précipitées par l'AcM A5 que par les AcM F4 et 4LO3311 chez la même souris, 3) la détection par l'AcM F4, mais non par les AcM A5 et 4LO3311, d'un hétérodimère homologue de l'antigène NK2 chez la souris NZB.

Les trois épitopes reconnus par les AcM A5, F4 et 4LO3311 chez la souris BALB/c sont de toute évidence distincts, mais assez rapprochés l'un de l'autre. Ces trois épitopes pourraient être situés sur une même molécule ou sur des molécules différentes, selon la souche de souris. L'épitope

reconnu par l'AcM A5 chez la souris BALB/c est activateur, mais à un degré moindre que l'épitope reconnu par l'AcM 4LO3311. Toutefois, l'épitope reconnu par l'AcM F4 chez la souris BALB/c est non activateur, ce qui concorde avec le fait qu'il semble reconnaître un épitope présent chez toutes les souches de souris testées. L'épitope reconnu par l'AcM F4 semble en général peu accessible comme le démontrent : 1) la difficulté d'inhiber la liaison de l'AcM F4-FITC par l'AcM F4 non conjugué correspondant, 2) l'augmentation spécifique de la liaison de l'AcM F4-FITC suite à la liaison des AcM A5 et 4LO3311, qui est vraisemblablement imputable à l'augmentation de l'accessibilité de l'épitope reconnu par l'AcM F4, et 3) l'intensité relativement forte de la bande correspondant à l'AcM F4 dans l'analyse électrophorétique chez la souris C57BL/6, alors que l'analyse en cytométrie indiquait que la molécule reconnue par l'AcM F4 était très faiblement exprimée.

Le fait qu'aucun des nouveaux AcM ne permet de déceler une forme homologue de l'antigène NK2 chez le rat, n'implique pas nécessairement qu'il n'en existe aucune. Le clonage des gènes *NK2* est requis pour pouvoir tirer une conclusion claire à cet effet. Les résultats obtenus avec l'AcM A5 dans les expériences avec les souris congéniques ne permettent pas de suggérer une influence des molécules de classe I exprimées par l'hôte sur l'expression de l'antigène NK2, comme il est possible de le faire à partir des résultats obtenus avec les AcM 4LO3311 et F4. Une hypothèse pouvant expliquer ceci a été avancée et est basée sur l'existence d'une molécule NK2 portant exclusivement l'épitope reconnu par l'AcM A5, l'existence possible

d'une telle molécule étant supportée par plusieurs résultats présentés dans ce mémoire.

Plusieurs voies s'ouvrent à la suite des résultats obtenus grâce aux nouveaux AcM anti-NK2. En effet, la poursuite du clonage du(des) gène(s) NK2 sera probablement facilitée par l'utilisation des AcM de hamster. De plus, des expériences de doubles marquages sur les cellules NK de la souris C57BL/6 permettront de déterminer l'identité des différentes sous-populations de cellules NK exprimant les épitopes reconnus par les AcM A5, F4 ou 4LO3311. Des expériences d'immunoprécipitation des protéines, suivie de leur déglycosylation, en conditions réductrices et non réductrices chez les souris BALB/c, C57BL/6 et NZB permettront de vérifier si les poids moléculaires des polypeptides précipités par les trois AcM sont identiques chez ces souches de souris. D'autres expériences d'immunoprécipitation, mais précédées de la déglycosylation, permettront de déterminer si les épitopes reconnus par les AcM A5, F4 et 4LO3311 sont glycosylés. Nos nouveaux AcM xénogéniques anti-NK2 ont été et seront sûrement dans l'avenir d'une grande utilité dans l'étude de cet antigène activateur spécifique des cellules NK murines.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Suzanne Lemieux pour son encadrement, son enseignement et sa compréhension. Je suis aussi très reconnaissante à Yvette Lusignan pour son infinie patience, son aide technique, sa gentillesse et son support constants. Je tiens aussi à remercier Pierre Gosselin ; son amitié et son aide furent toujours grandement appréciés.

Mes remerciements vont aussi à André Fafard, Marcel Desrosiers, Denise McSween et Jacqueline Lecomte, qui m'ont tous apporté une aide précieuse dans la réalisation de mon projet. Je dois aussi souligner la présence et le support moral de mes amis Catherine, Stéphane, Patricia, Martin, Alain, Sylvie, Nicolas, Hélène, Myriam, Benoît et tous les autres. Ils ont contribué à rendre mon séjour à l'Institut Armand-Frappier incomparable.

Je suis reconnaissante envers le Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie (CRSNG) pour son support financier.

BIBLIOGRAPHIE

- ANASETTI, C., P.J. MARTIN, C.H. JUNE, K.E. HELLSTROM, J.A. LEDBETTER, P.S. RABINOVITCH, Y. MOROSHITA, I. HELLSTROM et J.A. HANSEN. 1987. Induction of calcium flux and enhancement of cytolytic activity in natural killer cells by cross-linking of the sheep erythrocyte binding protein (CD2) and the Fc-receptor (CD16). *J. Immunol.* 139: 1772-1779.
- ANDERSON, P., M. CALIGIURI, J. RITZ et S.F. SCHLOSSMAN. 1989. CD3-negative natural killer cells express ζ TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 341: 159-162.
- ANDERSON, S.K., S. GALLINGER, J. RODER, J. FREY, H.A. YOUNG et J.R. ORTALDO. 1993. A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 542-546.
- ARAMBURU, J., M.A. BALBOA, A. RAMIREZ, A. SILVA, A. ACEVEDO, F. SANCHEZ-MADRID, M.O. DE LANDAZURI et M. LOPEZ-BOTET. 1990. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- γ/δ^+ T lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 144: 3238-3247.
- ARAMBURU, J., M.A. BALBOA, M. IZQUIERDO et M. LOPEZ-BOTET. 1991. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- γ/δ^+ T lymphocytes. II. Modulation of natural killer cytotoxicity by anti-Kp43 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 147: 714-721.
- BEZOUSKA, K., G. VLAHAS, O. HORVATH, G. JINOCHEVA, 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. 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.
- BIRON, C.A., P. VAN DEN ELSEN, M.M. TUTT, P. MEDVECZKY, V. KUMAR et C. TERHORST. 1987. Murine natural killer cells stimulated in vivo do not express the T cell receptor α , β , γ , T3 δ , or T3 ϵ genes. *J. Immunol.* 139: 1704-1710.

- BIRON, C.A., H.A. YOUNG et M.T. KASAIAN. 1990. Interleukin 2-induced proliferation of murine natural killer cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 171: 173-188.
- BIX, M., N.-S. LIAO, M. ZIJLSTRA, J. LORING, R. JAENISCH et D. RAULET. 1991. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 349: 329-331.
- BJORKMAN, P.J., M.A. SAPER, B. SAMRAOUI, W.S. BENNETT J.L. STROMINGER et D.C. WILEY. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518.
- BOTTINO, C., M. VITALE, L. OLCESE, S. SIVORI, L. MORELLI, R. AUGUGLIARO, E. CICCONE, L. MORETTA et A. MORETTA. 1994. The human natural killer cell receptor for major histocompatibility complex class I molecules. Surface modulation of p58 molecules and their linkage to CD3 ζ chain, Fc ϵ RI γ chain and the p56^{lck} kinase. *Eur. J. Immunol.* 24: 2527-2534.
- 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.
- BRIGHT, S.W., T. CHEN, L.M. FLEBBE, M. LEI et D.C. MORRISON. 1990. Generation and characterization of hamster-mouse hybridomas secreting monoclonal antibodies with specificity for lipopolysaccharide receptor. *J. Immunol.* 145: 1-7.
- CARLOW, D.A., U. PAYNE, N. HOZUMI, J.C. RODER et A.A. CZITROM. 1990. Class I (H-2K^b) gene transfection reduces susceptibility of YAC-1 lymphoma targets to natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 20: 841-846.
- CARPÉN, O., I. VIRTANEN et E. SAKSELA. 1982. Ultrastructure of human natural killer cells: nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion. *J. Immunol.* 128: 2691-2697.
- CARPÉN, O., I. VIRTANEN, V.-P. LEHTO et E. SAKSELA. 1983. Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J. Immunol.* 131: 2695-2698.
- CARSON, W.E., J.G. GIRI, M.J. LINDEMANN, M.L. LINETT, M. AHDIEH, R. PAXTON, D. ANDERSON, J. EISENMANN, K. GRABSTEIN et M.A. CALIGIURI. 1994. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* 180: 1395-1403.

- CASATELLA, M.A., I. ANEGON, M.C. CUTURI, P. GRISKEY, G. TRINCHIERI et B. PERUSSIA. 1989. Fc γ R(CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 169: 549-567.
- CHADWICK, B.S., S.R. SAMBHARA, Y. SASAKURA et R.G. MILLER. 1992. Effect of class I MHC binding peptides on recognition by natural killer cells. *J. Immunol.* 149: 3150-3156.
- 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.
- CHAMBERS, C.A., S. GALLINGER, S.K. ANDERSON, S. GIARDINA, J.R. ORTALDO, N. HOZUMI et J. RODER. 1994. Expression of the NK-TR gene is required for NK-like activity in human T cells. *J. Immunol.* 152: 2669-2674.
- CHAN, P.Y. et F. TAKEI. 1986. Expression of a T cell receptor-like molecule on normal and malignant murine T cells detected by rat monoclonal antibodies to nonclonotypic determinants. *J. Immunol.* 136: 1346-1353.
- CHAN, P.Y. et F. TAKEI. 1988. Characterization of a murine T cell disulphide-linked dimer of 45-kDa glycopeptides (YE1/48 antigen): comparison with T cell receptor, purification, and partial amino acid sequences. *J. Immunol.* 140: 161-169.
- 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.
- CHONG, A.S.-F., P. SCUDERI, W. GRIMES et E.M. HERSH. 1989. Tumor targets stimulate IL-2 activated killer cells to produce interferon- γ and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 142: 2133-2139.
- CICCONE, E., D. PENDE, M. VITALE, L. NANNI, C. DI DONATO, C. BOTTINO, L. MORELLI, O. VIALE, A. AMOROSO, A. MORETTA et L. MORETTA. 1994. Self class I molecules protect normal cells from lysis mediated by autologous killer cells. *Eur. J. Immunol.* 24: 1003-1006.
- COLONNA, M., G. BORSELLINO, M. FALCO, G.B. FERRARA et J.L. STROMINGER. 1993. HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 12000-12004.

- CONRAD, D.H. 1990. FcεRII/CD23: The low affinity receptor for IgE. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 623-645.
- CORREA, I., L. CORRAL et D.H. RAULET. 1994. Multiple natural killer cell-activating signals are inhibited by major histocompatibility complex class I expression in target cells. *Eur. J. Immunol.* **24**: 1323-1331.
- CUTURI, M.C., I. ANEGON, F. SHERMAN, R. LOUDON, S.C. CLARK, B. PERUSSIA et G. TRINCHIERI. 1989. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **169**: 569-583.
- 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.
- DEALTRY, G.B., M.S. NAYLOR, W. FIERS et F.R. BALKWILL. 1987. DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon-γ. *Eur. J. Immunol.* **17**: 689-693.
- DRICKAMER, K. 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* **263**: 9557-9560.
- DUKE, R.C., J.J. COHEN et R. CHERVENAK. 1986. Differences in target cell DNA fragmentation induced by mouse cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *J. Immunol.* **137**: 1442-1447.
- FALK, K., O. ROTZSCHKE, S. STEVANOVIC, G. JUNG et H.-G. RAMMENSEE. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**: 290-296.
- 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.
- GEROSA, F., M. TOMMASI, M. SCARDONI, R.S. ACCOLLA, T. POZZAN, M. LIBONATI, G. TRIDENTE et G. CARRA. 1991. Structural analysis of the CD69 early activation antigen by two monoclonal antibodies directed to different epitopes. *Mol. Immunol.* **28**: 159-168.

- 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.
- GLIMCHER, L., F.W. SHEN et H. CANTOR. 1977. Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell. *J. Exp. Med.* **145**: 1-9.
- GOODMAN, T. et L. LEFRANÇOIS. 1989. Intraepithelial lymphocytes (anatomical site, not T cell receptor form, dictates phenotype and function). *J. Exp. Med.* **170**: 1569-1581.
- GOSSELIN, P. 1995. Analysis of the structure and the modulation of a specific alloantigen of murine natural killer (NK) cells. Thèse de Ph.D. Department of Medicine, Division of Experimental Medicine, McGill University.
- 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 et S. LEMIEUX. 1995. The activation receptor NK2.1 is encoded by a gene linked to the NK gene complex and its expression is regulated by H-2 and non-H-2-dependent factors. Manuscrit soumis.
- GRIMM, E.A., A. MAZUMDER, H.Z. ZHANG et S.A. ROSENBERG. 1982. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukine 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* **155**: 1823-1841.
- HOUCHINS, J.P., T. YABE, C. McSHERRY et F.H. BACH. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **173**: 1017-1020.
- JOAG, S., A. ZYCHLINSKY et J.D. YOUNG. 1989. Mechanisms of lymphocyte-mediated lysis. *J. Cell Biochem.* **39**: 239.

- KÄGI, D., B. LEDERMANN, K. BÜRKI, P. SEILER, B. ODERMATT, K.J. OLSEN, E.R. PODACK, R.M. ZINKERNAGEL et H. HENGARTNER. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* **369**: 31-37.
- KANE, K.P. 1994. Ly-49 mediates EL4 lymphoma adhesion to isolated class I major histocompatibility complex molecules. *J. Exp. Med.* **179**: 1011-1015.
- KARLHOFER, F.M. et W.M. YOKOYAMA. 1991. Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. *J. Immunol.* **146**: 3662-3673.
- KARLHOFER, 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.
- KARLHOFER, F.M., R. HUNZIKER, A. REICHLIN, D.H. MARGULIES et W.M. YOKOYAMA. 1994. Host MHC Class I molecules modulate in vivo expression of a NK cell receptor. *J. Immunol.* **153**: 2407-2416.
- KÄRRE, K., H.-G. LJUNGGREN, G. PIONTEK et R. KIESSLING. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**: 675-678.
- KÄRRE, K. 1995. Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells. *Science* **267**: 978-979.
- KAUFMAN, D.S., R.A. SCHOON et P.J. LEIBSON. 1992. Role for major histocompatibility complex class I in regulating natural killer cell-mediated killing of virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8337-8341.
- KAUFMAN, D.S., R.A. SCHOON et P.J. LEIBSON. 1993. MHC class I expression on tumor targets inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity without interfering with target recognition. *J. Immunol.* **150**: 1429-1436.
- KIESSLING, R., E. KLEIN, H. PROSS et H. WIGZELL. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Maloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur. J. Immunol.* **5**: 117-121.
- KIESSLING, R., P.S. HOCHMAN, O. HALLER, G.M. SHEARER, H. WIGZELL et G. CUDKOWICZ. 1977. Evidence for a similar or common mechanism for natural killer cell activity and resistance to hemopoietic grafts. *Eur. J. Immunol.* **7**: 655-663.

- KOBAYASHI, M., L. FITZ, M. RYAN, R.M. HEWICK, S.C. CLARK, S. CHAN, R. LOUDON, F. SHERMAN, B. PERUSSIA et G. TRINCHIERI. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF). *J. Exp. Med.* 170: 827-846.
- KOHL, S., T.A. SPRINGER, F.C. SCHMALSTIEG, L.S. LOO et D.C. ANDERSON. 1984. Defective natural killer cytotoxicity and polymorphonuclear leukocyte antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with LFA-1/OKM1 deficiency. *J. Immunol.* 133: 2972-2978.
- KOO, G.C. et J.R. PEPPARD. 1984. Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. *Hybridoma* 3: 301-303.
- KRANGEL, M.S., H.T. ORR et J.L. STROMINGER. 1979. Assembly and maturation of HLA-A and HLA-B antigens *in vivo*. *Cell* 18:979-991.
- KUBO, R.T., W. BORN, J.W. KAPPLER, P. MARRACK et M. PIGEON. 1989. Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine $\alpha\beta$ T cell receptors. *J. Immunol.* 142: 2736-2742.
- KUPFER, A., G. DENNERT et S.J. SINGER. 1983. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7224-7228.
- KUPFER, A. et G. DENNERT. 1984. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J. Immunol.* 133: 2762-2766.
- LANIER, L.L., J.H. PHILLIPS, J. Jr HACKETT, M. TUTT et V. KUMAR. 1986. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.* 137: 2735-2739.
- LANIER, L.L., G. YU et J.H. PHILLIPS. 1989. Co-association of CD3 ζ with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342: 803-805.
- LANIER, L.L., G. YU et J.H. PHILLIPS. 1991. Analysis of Fc γ RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 ζ and Fc ϵ RI- γ by site-directed mutation. *J. Immunol.* 146: 1571-1576.
- LANIER, L.L., C. CHANG et J.H. PHILLIPS. 1994. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J. Immunol.* 153: 2417-2428.

- LEIDEN, J.M., B.A. KARPINSKI, L. GOTTSCHALK et J. KORNBLUTH. 1989. Susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity is independent of the level of target cell class I HLA expression. *J. Immunol.* **142**: 2140-2147.
- LEMIEUX, S., F. OUELLET-TALBOT, Y. LUSIGNAN, L. MORELLI, N. LABRÈCHE, P. GOSSELIN et J. LECOMTE. 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.
- LEO, O., D.H. SACHS, L.E. SAMELSON, M. FOO, R. QUINONES, R. GRESS et J.A. BLUESTONE. 1986. Identification of monoclonal antibodies specific for the T cell receptor complex by FC receptor-mediated CTL lysis. *J. Immunol.* **137**: 3874-3880.
- LEO, O., M. FOO, D.H. SACHS, L.E. SAMELSON et J.A. BLUESTONE. 1987. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1374-1378.
- LINNEMEYER, P.A., J.M. TSUJI, S. GILL et S.B. POLLACK. 1994. Hamster monoclonal antibodies to murine natural killer cells. *Nat. Immun.* **13**: 49-60.
- LITWIN, V., J. GUMPERZ, P. PARHAM, J.H. PHILLIPS et L.L. LANIER. 1994. NKB1: A natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J. Exp. Med.* **180**: 537-543.
- LJUNGGREN, H.-G. et K. KÄRRE. 1990. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* **11**(7): 237-244.
- 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., B.J. MATHIESON et J.R. ORTALDO. 1990. Natural killer (NK) cell subsets in the mouse. NK-1.1⁺/LGL-1⁺ cells restricted to lysing NK targets, whereas NK-1.1⁺/LGL-1⁻ cells generate lymphokine-activated killer cells. *J. Immunol.* **145**: 751-759.
- MASON, L.H., H. YAGITA et J.R. ORTALDO. 1994a. LGL-1: a potential triggering molecule on murine NK cells. *J. Leukoc. Biol.* **55**: 362-370.
- MASON, L.M., H.A. YOUNG, J.R. ORTALDO et S.A. ANDERSON. 1994b. Cloning of LGL-1. *Nat. Immun.* **13**(4): 221-222.

- 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.
- 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, B., Editor. 1993. *Methods in Cell Biology Vol. 38: Cell Biological applications of Confocal Microscopy*. Academic Press, Toronto.
- MAXFIELD, S.R., K. MOULDER, F. KONING, A. ELBE, G. STINGL, J.E. COLIGAN, E.M. SHEVACH et W.M. YOKOYAMA. 1989. Murine T cells express a cell surface receptor for multiple extracellular matrix proteins. Identification and characterization with monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 169: 2173-2190.
- McCOY, J.P. Jr et W.H. CHAMBERS. 1991. Carbohydrates in the functions of natural killer cells. *Glycobiology* 1(4): 321-328.
- METLAY, J.P., M.D. WITMER-PACK, R. AGGER, M.T. CROWLEY, D. LAWLESS et R.M. STEINMAN. 1990. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 171: 1753-1771.
- MORELLI, L., Y. LUSIGNAN et S. LEMIEUX. 1992. Heterogeneity of natural killer cell subsets in NK-1.1⁺ and NK-1.1⁻ inbred mouse strains and their progeny. *Cell. Immunol.* 141: 148-160.
- MORELLI, L. et S. LEMIEUX. 1993. Triggerring of the cytotoxic activity of murine natural killer (NK) and lymphokine-activated killer cells through the NK2.1 antigen. *J. Immunol.* 151: 6783-????.
- MORETTA, L., E. CICCONE, A. MORETTA, P. HÖGLUND, C. ÖHLÉN et K. KÄRRE. 1992. Allorecognition by NK cells: nonself or no self? *Immunol. Today* 13(8): 300-306.
- MORETTA, A., M. VITALE, C. BOTTINO, A.M. ORENCO, L. MORELLI, R. AUGUGLIARO, M. BARBARESI, E. CICCONE et L. MORETTA. 1993. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J. Exp. Med.* 178: 597-604.

- MORETTA, A., M. VITALE, S. SIVORI, C. BOTTINO, L. MORELLI, R. AUGUGLIARO, M. BARBARESI, D. PENDE, E. CICCONE, M. LOPEZ-BOTET et L. MORETTA. 1994. Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules. Evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles. *J. Exp. Med.* **180**: 545-555.
- NAGASAWA, R., J. GROSS, K. KANAGAWA, L. TOWNSEND, L. LANIER, J. CHILLER et J.P. ALLISON. 1987. Identification of a novel T cell surface disulfide-bonded dimer distinct from the α/β antigen receptor. *J. Immunol.* **138**: 815-824.
- NISHIMURA, T. et T. ITOH. 1988. Higher level expression of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) on in vivo natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* **18**: 2077-2080.
- NISHIMURA, M.I., I. STROYNOWSKI, L. HOOD et S. OSTRAND-ROSENBERG. 1988. H-2K^b antigen expression has no effect on natural killer susceptibility and tumorigenicity of a murine hepatoma. *J. Immunol.* **141**: 4403-4409.
- OLSSON, M.Y., K. KÄRRE et C.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.
- OSHEA, J.J., D.W. McVICAR, D.B. KUHNS et J.R. ORTALDO. 1992. A role for protein tyrosine kinase activity in natural cytotoxicity as well as antibody-dependent cellular cytotoxicity. Effects of herbimycin. *J. Immunol.* **148**: 2497-2502.
- PERUSSIA, B., M.M. TUTT, W.Q. QIU, W.A. KUZIEL, P.W. TUCKER, G. TRINCHIERI, M. BENNETT, J.V. RAVETCH et V. KUMAR. 1989. Murine natural killer cells express functional Fc γ receptor II encoded by the Fc γ R α gene. *J. Exp. Med.* **170**: 73-86.
- PERUSSIA, B. 1991. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **3**: 49-55.
- PHILLIPS, J.H., T. TAKESHITA, K. SUGAMURA et L.L. LANIER. 1989. Activation of natural killer cells via the p75 interleukin 2 receptor. *J. Exp. Med.* **170**: 291-296.

- PIONTEK, G.E., K. TANIGUCHI, H.-G. LJUNGGREN, A. GRÖNBERG, R. KIESSLING, G. KLEIN et K. KÄRRE. 1985. YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or *in vivo* passage. *J. Immunol.* **135**: 4281-4288.
- POCHON, S., P. GRABER, M. YEAGER, K. JANSEN, A.R. BERNARD, J.P. AUBRY et J.Y. BONNEFOY. 1992. Demonstration of a second ligand for the low affinity receptor for immunoglobulin E (CD23) using recombinant CD23 reconstituted into fluorescent liposomes. *J. Exp. Med.* **176**: 389-397.
- POLLACK, S.B. et S.L. EMMONS. 1982. NK-2.1: an associated antigen detected with NZB anti-BALB/c serum. *J. Immunol.* **129**: 2277-2281.
- PULLEN, A.M., P. MARRACK et J.W. KAPPLER. 1988. The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* **335**: 796-801.
- QUANHUI, L., L. PETTERA, D. STEIN, Z. GARCIA et P. FITZGERALD-BOCARSLY. 1992. *FASEB J.* **6**:A2025 (résumé).
- QUILLET, A., F. PRESSE, C. MARCHIOL-FOURNIGAULT, A. HAREL-BELLAN, M. BENBUNAN, H. PLOEGH et D. FRADELIZI. 1988. Increased resistance to non-MHC-restricted cytotoxicity related to HLA A, B expression. Direct demonstration using β_2 -microglobulin-transfected Daudi cells. *J. Immunol.* **141**: 17-20.
- RAVETCH, J.V. et B. PERUSSIA. 1989. Alternative membrane forms of Fc γ RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils: cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* **170**: 481-497.
- REMBECKI, R.M., V. KUMAR, C.S. DAVID et M. BENNETT. 1988. Polymorphism of *Hh-1*, the mouse hemopoietic histocompatibility locus. *Immunogenetics* **28**: 158-170.
- ROBERTSON, M.J. et J. RITZ. 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* **76**(12): 2421-2438.
- ROCHET, N., P. ANDERSON et E. VIVIER. 1992. Structure et fonction du complexe CD16 : ζ : γ des cellules NK. *Médecine/Sciences* **8**: 359-365.
- RODER, J.C. et R. KIESSLING. 1978. Targer-effector interaction in the natural killer cell system. I. Covariance and genetic control of cytolytic and target-cell-binding subpopulations in the mouse. *Scand. J. Immunol.* **8**: 135-144.

- RODER, J.C., T.J. BEAUMONT, R.S. KERBEL, T. HALIOTIS et D. KOZBOR. 1981. Selective natural killer resistance in a clone of YAC lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6396-6400.
- ROLAND, J. et P.-A. CAZENAVE. 1992. Ly-49 antigen defines an $\alpha\beta$ TCR population in i-IEL with an extrathymic maturation. *Inter. Immunol.* 4(6): 699-706.
- ROTH, C., P. KOURILSKY et D.M. OJCIUS. 1994. Ly-49-independent inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by a soluble major histocompatibility complex class I molecule. *Eur. J. Immunol.* 24: 2110-2114.
- RYAN, J.C., E.C. NIEMI, R.D. GOLDFIEN, J.C. HISERODT et W.E. SEAMAN. 1991. NKR-P1, an activating molecule on rat natural killer cells, stimulates phosphoinositide turnover and a rise in intracellular calcium. *J. Immunol.* 147: 3244-3250.
- 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.
- SALCEDO, T.W., T. KUROSAKI, P. KANAKARAJ, J.V. RAVETCH et B. PERUSSIA. 1993. Physical and functional association of p56^{lck} with Fc γ RIIIA (CD16) in natural killer cells. *J. Exp. Med.* 177: 1475-1480.
- SANCHEZ-MADRID, F., P. SZKLUT et T.A. SPRINGER. 1983. Stable hamster-mouse hybridomas producing IgG and IgM hamster monoclonal antibodies of defined specificity. *J. Immunol.* 130: 309-312.
- SCALZO, A.A., N.A. FITZGERALD, C.R. WALLACE, A.E. GIBBONS, Y. CHENG SMART, R.C. BURTON et G.R. SHELLAM. 1992. The effect of the *Cmv-1* resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J. Immunol.* 149: 581-589.
- SCHREIBER, R.D., J.J. HICKS, A. CELADA, N.A. BUCHMEIER et P.W. GRAY. 1985. Monoclonal antibodies to murine γ -interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. *J. Immunol.* 134: 1609-1618.
- SENTMAN, C.L., J. Jr. HACKETT, V. KUMAR et M. BENNETT. 1989a. 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.

- SENTMAN, C.L., J. HACKETT, T.A. MOORE, M.M. TUTT, M. BENNETT et V. KUMAR. 1989b. Pan natural killer cell monoclonal antibodies and their relationship to the NK1.1 antigen. *Hybridoma* **8**: 605-614.
- SENTMAN, C.L., V. KUMAR et M. BENNETT. 1991. Rejection of bone marrow cell allografts by natural killer cell subsets: 5E6⁺ cell specificity for Hh-1 determinant 2 shared by H-2^d and H-2^f. *Eur. J. Immunol.* **21**: 2821-2828.
- SENTMAN, C.L., M.Y. OLSSON, M. SALCEDO, P. HÖGLUND, U. LENDAHL et K. KÄRRE. 1994. H-2 allele-specific protection from NK cell lysis in vitro for lymphoblasts but not tumor targets. Protection mediated by $\alpha 1/\alpha 2$ domains. *J. Immunol.* **153**: 5482-5490.
- SHEEHAN, K.C.F., N.H. RUDDLE et R.D. SCHREIBER. 1989. Generation and characterization of hamster monoclonal antibodies that neutralize murine tumor necrosis factors. *J. Immunol.* **142**: 3884-3893.
- SHI, L., R.P. KRAUT, R. AEBERSOLD et A.H. GREENBERG. 1992. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* **175**: 553-566.
- SMITH, H.R.C., F.M. KARLHOFER et W.M. YOKOYAMA. 1994. Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated NK cells. *J. Immunol.* **153**: 1068-1079.
- STONEMAN, E., V. KUMAR, M. BENNETT et P.A. MATHEW. 1993. Molecular cloning of an NK cell surface molecule expressed on a subset of cells that mediate specific rejection of Hh-1^d positive marrow cells. *J. Immunol.* **150**: 257A (1465; Résumé).
- STONEMAN, E.R., M. BENNETT, J. AN, K.A. CHESNUT, E.K. WAKELAND, J.B. SCHEERER, 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.
- STORKUS, W.J., D.N. HOWELL, R.D. SALTER, J.R. DAWSON et P. CRESSWELL. 1987. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J. Immunol.* **138**: 1657-1659.
- STORKUS, W.J., J. ALEXANDER, J.A. PAYNE, J.R. DAWSON et P. CRESSWELL. 1989a. Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2361-2364.

- STORKUS, W.J., J. ALEXANDER, J.A. PAYNE, P. CRESSWELL et J.R. DAWSON. 1989b. The $\alpha 1/\alpha 2$ domains of class I HLA molecules confer resistance to natural killing. *J. Immunol.* 143: 3853-3857.
- STORKUS, W.J. et J.R. DAWSON. 1991. Target structures involved in natural killing (NK): characteristics, distribution, and candidate molecules. *Immunology* 10(5): 393-416.
- STORKUS, W.J., R.D. SALTER, J. ALEXANDER, F.E. WARD, R.E. RUIZ, P. CRESSWELL et J.R. DAWSON. 1991. Class I-induced resistance to natural killing: Identification of nonpermissive residues in HLA-A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5989-5992.
- STORKUS, W.J., R.D. SALTER, P. CRESSWELL et J.R. DAWSON. 1992. Peptide-induced modulation of target cell sensitivity to natural killing. *J. Immunol.* 149: 1185-1190.
- STURMHÖFEL, K. et G.J. HÄMMERLING. 1990. Reconstitution of H-2 class I expression by gene transfection decreases susceptibility to natural killer cells of an EL4 class I loss variant. *Eur. J. Immunol.* 20: 171-177.
- TESTI, R., D. D'AMBROSIO, R. DE MARIA et A. SANTONI. 1994. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today* 15(10): 479-483.
- TIMONEN, T., M. PATARROYO et C.G. GAHMBERG. 1988. CD11a-c/CD18 and GP84 (LB-2) adhesion molecules on human large granular lymphocytes and their participation in natural killing. *J. Immunol.* 141: 1041-1046.
- TRINCHIERI, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47: 187-376.
- TUTT, M.M., W.A. KUZIEL, J. Jr HACKETT, M. BENNETT, P.W. TUCKER et V. KUMAR. 1986. Murine natural killer cells do not express functional transcripts of the α -, β -, or γ -chains of the T cell receptor. *J. Immunol.* 137: 2998-3001.
- VERSTEEG, R., I.A. NOODERMEER, M. KRÜSE-WOLTERS, D.J. RUITER et P.I. SCHRIER. 1988. *c-myc* down-regulates class I HLA expression in human melanomas. *EMBO J.* 7(4): 1023-1029.
- VIVIER, E., P. MORIN, C. O'BRIEN, B. DRUKER, S.F. SCHLOSSMAN et P. ANDERSON. 1991. Tyrosine phosphorylation of the Fc γ RIII(CD16): ζ complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J. Immunol.* 146: 206-210.

- VOSHOL, H., H.F.J. DULLENS, W. DEN OTTER et J.F.G. VLIAGENTHART. 1993. Cell surface glycoconjugates as possible target structures for human natural killer cells: evidence against the involvement of glycolipids and N-linked carbohydrate chains. *Glycobiology* **3**(1): 69-76.
- WAGTMANN, N., R. BIASSONI, M. MALNATI, A. MORETTA et E.O. LONG. 1994. Purification of a member of the p58 family of putative NK cell surface receptors. *Nat. Immunity*. **13**:195 (résumé)
- WARNER, J.F. et G. DENNERT. 1982. Effects of a cloned cell line with NK activity on bone marrows transplants, tumor development, and metastasis *in vivo*. *Nature* **300**: 31-34.
- 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.
- YABE, T., C. McSHERRY, F. H. BACH, P. FISCH, R.P. SCHALL, P.M. SONDEL et J.P. HOUCHINS. 1993. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics* **37**: 455-460.
- YOKOYAMA, W.M., L.B. JACOBS, O. KANAGAWA, E.M. SHEVACH et D.I. COHEN. 1989. A murine T lymphocyte antigen belongs to a surpergene family of type II integral membrane proteins. *J. Immunol.* **143**: 1379-1386.
- 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 NK 1.1 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. 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.
- YOKOYAMA, W.M. 1995. Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 110-120.

- YOUNG, H.A., N.A. JENKINS, N.G. COPELAND, S. SIMEK, M.I. LERMAN, B. ZBAR, G. GLENN, J.R. ORTALDO et S.K. ANDERSON. 1993. Localization of a novel natural killer triggering receptor locus to human chromosome 3p23-21 and mouse chromosome 9. *Genomics* **16**: 548.
- ZIEGLER, S.F., S.D. LEVIN, L. JOHNSON, N.G. COPELAND, D.J. GILBERT, N.A. JENKINS, E. BAKER, G.R. SUTHERLAND, A.L. FELDHAUS et F. RAMSDELL. 1994. The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. *J. Immunol.* **152**: 1228-1236.
- ZIJLSTRA, M., H. AUCHINCLOSS, J.M. LORING, C.M. CHASE, P.S. RUSSELL et R. JAENISCH. 1992. Skin graft rejection by β_2 -microglobulin-deficient mice. *J. Exp. Med.* **175**: 885-893.