

**Université du Québec**

**INRS-Institut Armand-Frappier**

# **Le rôle de DAP12 dans la phagocytose par les récepteurs Fc**

**Par  
Angélique Longtin**

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

## **Jury d'évaluation**

<b>Président du jury</b>	<b>Denis Girard</b>
<b>Examineur externe</b>	<b>Hélène-Marie Thérien</b>
<b>Directrice de recherche</b>	<b>Pascale Duplay</b>
<b>Co-directeur de recherche</b>	<b>Albert Descoteaux</b>

## RÉSUMÉ

DAP12 est une protéine transmembranaire qui doit s'associer à un récepteur afin d'être exprimée à la surface de la cellule. Le domaine cytoplasmique de cette protéine comprend une séquence consensus ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ») suffisante pour initier une cascade d'activation cellulaire.

C'est chez les cellules NK que les fonctions associées à DAP12 ont été le mieux caractérisées, puisque plusieurs récepteurs associés à DAP12 dont la fonction est bien définie ont été identifiés chez ces cellules. Par contre, les fonctions attribuées aux récepteurs associés à DAP12 exprimés chez les cellules myéloïdes (MDL-1, SIRP $\beta$ 1, TREM-1, TREM-2, TREM-3) demeurent peu connues. Par conséquent, nous avons choisi d'étudier le rôle joué par DAP12 dans l'exercice de différentes fonctions du macrophage.

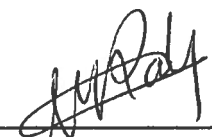
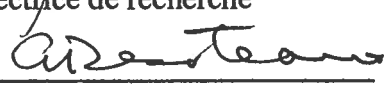
Pour ce faire, nous avons exprimé de façon stable dans la lignée de macrophages murins RAW 264.7 une version de type sauvage et une version mutée de la protéine DAP12. Ces deux versions sont étiquetées à l'aide d'un épitope Flag (Flag-DAP12). La version modifiée (Flag-DAP12-Y76F) contient une mutation qui remplace le second résidu tyrosine de l'ITAM pour un résidu phénylalanine (Y75F). Cette altération prévient le recrutement de la protéine tyrosine kinase Syk à l'ITAM de DAP12 et par la même occasion inhibe les fonctions exercées par DAP12. En effet, le pontage à l'aide d'anticorps de Flag-DAP12, mais non de Flag-DAP12-Y76F, induit la sécrétion de TNF- $\alpha$ . Par conséquent, la surexpression de cette protéine mutée devrait avoir un effet dominant-négatif (DN) sur la cellule.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux fonctions exercées par DAP12 lors de la phagocytose via les récepteurs Fc $\gamma$ R. Dans ces expériences, nous avons utilisé des érythrocytes de moutons opsonisés avec des immunoglobulines de type G (IgG-SRBC). La phagocytose d'IgG2a-SRBC est augmentée de façon significative chez les cellules exprimant la version mutée de DAP12. Cette hausse est due à la fois à une augmentation de la cinétique

d'attachement et à une augmentation de la cinétique d'internalisation des IgG2a-SRBC. Nous avons alors analysé par microscopie confocale le processus de polymérisation de l'actine filamenteuse lors de l'attachement des IgG2a-SRBC. Ces expériences ont démontré que la formation de coupes d'actine sous la particule à ingérer est plus rapide chez les cellules exprimant la forme mutée de DAP12.

Aucun effet spécifiquement associé à DAP12 n'a pu être observé lors de la phagocytose d'IgG2b-SRBC, d'IgG3-SRBC et de billes de latex nues. Nos résultats suggèrent ainsi que la protéine DAP12 est impliquée dans la phagocytose via les FcγRI, en partie grâce à une régulation négative de la polymérisation de l'actine lors de ce processus.

  
Étudiante

  
Directrice de recherche  
  
Co-directeur de recherche



## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des figures et des tableaux</b> .....	<b>ix</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Revue bibliographique</b> .....	<b>4</b>
1. DAP12.....	<b>5</b>
1.1 Découverte et description.....	<b>5</b>
1.2 Distribution.....	<b>8</b>
1.3 Transduction des signaux via DAP12.....	<b>8</b>
2. Récepteurs activateurs : association avec DAP12 chez les cellules NK.....	<b>9</b>
3. Récepteurs associés à DAP12 chez les cellules myéloïdes.....	<b>9</b>
3.1 Superfamille des lectines de type C.....	<b>10</b>
3.1.1 MDL-1.....	<b>10</b>
3.2 Superfamille des immunoglobulines.....	<b>12</b>
3.2.1 SIRP $\beta$ 1.....	<b>12</b>
3.2.2 TREM-1.....	<b>13</b>
3.2.3 TREM-2.....	<b>15</b>
3.2.4 TREM-3, -4, -5.....	<b>17</b>
4. DAP12 : une molécule multifonctionnelle.....	<b>18</b>
4.1 La souris déficiente en DAP12.....	<b>19</b>
5. Le macrophage.....	<b>23</b>
5.1 Définition et description.....	<b>23</b>
5.2 Rôle du macrophage.....	<b>23</b>
5.3 Récepteurs du macrophage : les récepteurs Fc.....	<b>24</b>
5.3.1 Fc $\gamma$ R : définition générale.....	<b>26</b>
5.3.2 Fc $\gamma$ RI (ou CD64).....	<b>26</b>
5.3.3 Fc $\gamma$ RII (ou CD32).....	<b>27</b>
5.3.4 Fc $\gamma$ RIII (ou CD16).....	<b>28</b>
6. Phagocytose via les Fc $\gamma$ R.....	<b>29</b>
6.1 Reconnaissance du ligand et agrégation des récepteurs.....	<b>30</b>
6.2 Transduction des signaux.....	<b>31</b>
6.3 Extension des pseudopodes.....	<b>35</b>
6.4 Polymérisation de l'actine filamenteuse.....	<b>36</b>
6.5 Internalisation de la particule.....	<b>38</b>
6.6 Maturation du phagosome.....	<b>39</b>

<b>Article</b> .....	41
Abstract.....	43
Abbreviations used.....	44
Introduction.....	45
Materials and methods.....	47
Results.....	53
Discussion.....	58
Acknowledgements.....	63
Figure legends.....	64
References.....	68
Figures.....	76
<b>Discussion</b> .....	85
<b>Remerciements</b> .....	96
<b>Bibliographie</b> .....	98
<b>Annexe I</b> .....	119

## Liste des abréviations

<b>a.a.</b>	: acide aminé
<b>ADCC</b>	: «Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity»
<b>ADNc</b>	: ADN complémentaire
<b>ARNm</b>	: ARN messenger
<b>BCR</b>	: «B-Cell Receptor»
<b>CMH</b>	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CD</b>	: «Cluster of Differentiation»
<b>CCR7</b>	: «CC Chemokine Receptor 7»
<b>CPA</b>	: Cellule Présentatrice d'Antigènes
<b>DAP12</b>	: «DNAX-Activation Protein 12»
<b>ERK</b>	: «Extracellular-signal Regulated Kinase»
<b>FcR</b>	: Récepteur pour la portion Fc des Ig
<b>FcγR</b>	: Récepteur pour la portion Fc des IgG
<b>FcRγ</b>	: Chaîne γ associée aux FcR
<b>G-CSF</b>	: «Granulocyte Colony Stimulating Factor»
<b>GDI</b>	: «GDP Dissociation Inhibitor»
<b>GM-CSF</b>	: «Granulocyte and Macrophage Colony Stimulating Factor»
<b>IFN</b>	: Interféron
<b>Ig</b>	: Immunoglobuline
<b>IL</b>	: Interleukine
<b>ITAM</b>	: «Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif»
<b>ITIM</b>	: «Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif»
<b>KAR</b>	: «Killer cell Activating Receptor»
<b>kDa</b>	: kilodalton
<b>KIR</b>	: «Killer cell Inhibiting Receptor»
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharide
<b>MAPK</b>	: «Mitogen Activated Protein Kinases»
<b>MCP-1</b>	: «Monocyte Chemoattractant Protein-1»

<b>MDL-1</b>	: «Myeloid DAP12-associating Lectin-1»
<b>MPO</b>	: Myélopéroxydase
<b>NK</b>	: «Natural Killer»
<b>NO</b>	: Oxyde nitrique (ou monoxyde d'azote)
<b>PI 3-K</b>	: Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PIP</b>	: Phosphatidylinositol Phosphate
<b>PLC-<math>\gamma</math></b>	: Phospholipase C $\gamma$
<b>PTK</b>	: Protéine Tyrosine Kinase
<b>PTP</b>	: Protéine Tyrosine Phosphatase
<b>SIRP<math>\beta</math>1</b>	: «Signal-Regulatory Protein-beta 1»
<b>SHIP</b>	: «SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase»
<b>SH2</b>	: «Src-Homology domain 2»
<b>SRBC</b>	: «Sheep Red Blood Cell», érythrocyte de mouton
<b>TCR</b>	: «T-Cell Receptor»
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: «Transforming Growth Factor-beta»
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: «Tumor Necrosis Factor-alpha»
<b>TREM</b>	: «Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells»



## Liste des figures et des tableaux

<b>Figure A.</b> Structure de DAP12.....	6
<b>Figure B.</b> Structure des différents récepteurs associés à DAP12 exprimés chez les cellules myéloïdes.....	11
<b>Figure C.</b> Signalisation via les FcγR.....	31
<b>Figure D.</b> Mécanisme d'action proposé pour DAP12 lors de la phagocytose via FcγRI.....	89
<b>Tableau A.</b> Affinité préférentielle des FcγR murins pour les différentes immunoglobulines de type G.....	27
<b>Figure 1.</b> Western blot and flow cytometry analysis of transfected cells.....	76
<b>Figure 2.</b> Y76F mutation abolishes DAP12-mediated secretion of TNF-α.....	77
<b>Figure 3.</b> RAW 264.7 expression of DAP12-associated receptors.....	78
<b>Figure 4.</b> Role of DAP12 in phagocytosis.....	79
<b>Figure 5.</b> Effect of Flag-DAP12-Y76F overexpression on the attachment and internalization of IgG2a-opsonized SRBC by RAW 264.7 macrophages.....	80
<b>Figure 6.</b> Cell surface expression of Fcγ receptors.....	81
<b>Figure 7.</b> Analysis of F-actin assembly surrounding bound IgG2a-SRBC.....	82
<b>Figure 8.</b> Phosphorylation of Syk in IgG2a-SRBC phagocytosis.....	83
<b>Figure 9.</b> Implication of DAP12 in FcγRI-mediated phagocytosis.....	84

## **INTRODUCTION**

La protéine DAP12 possède un domaine extracellulaire court, un résidu chargé dans son domaine transmembranaire et un motif ITAM dans son domaine cytoplasmique. En ce sens, cette protéine est donc homologue à la chaîne  $\gamma$  des récepteurs Fc et à la chaîne  $\zeta$  du TCR. On retrouve la protéine DAP12 sous forme homodimérique chez les cellules NK, les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages [1].

Lorsque la protéine DAP12 est pontée à l'aide d'anticorps, les résidus tyrosine de son ITAM sont phosphorylés. Cette phosphorylation est l'oeuvre des protéines tyrosine kinases de la famille Src et cause le recrutement de la protéine tyrosine kinase Syk. Cette dernière initiera ensuite certaines cascades d'activation cellulaire [1-9].

La très grande majorité des récepteurs associés à DAP12 possèdent des caractéristiques communes telles un domaine cytoplasmique dépourvu de motifs de signalisation ainsi qu'un domaine transmembranaire comprenant un résidu chargé positivement, permettant l'association du récepteur avec DAP12. Chez les cellules NK, plusieurs récepteurs associés à DAP12 ont été identifiés à ce jour. La plupart de ces récepteurs activateurs (Ly49, KIR, CD94/NKG2, NKp44) possèdent comme ligands les molécules du CMH de classe I à la surface des cellules cibles. DAP12 joue par conséquent un rôle important dans l'activation des propriétés cytotoxiques des cellules NK [1, 3, 4, 6, 7, 10-18].

Chez les cellules myéloïdes, les récepteurs associés à DAP12 identifiés jusqu'à présent sont MDL-1 (« Myeloid DAP12-associating Lectin-1 ») [19], SIRP $\beta$ 1 (« Signal Regulatory Protein  $\beta$ -1 ») [8], TREM-1, TREM-2 et TREM-3 (« Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1, -2, -3 ») [20-22]. Les rôles physiologiques attribués à ces molécules n'ont pas encore été entièrement déterminés. Par contre, il a été suggéré que chez les cellules myéloïdes, DAP12 est impliqué dans l'activation pro-inflammatoire, la différenciation cellulaire, la maturation cellulaire, la présentation d'antigènes et la sécrétion de cytokines [8, 19-28].

La construction de souris déficientes pour la protéine DAP12 a permis d'établir que cette protéine participe activement à la stimulation de réponses immunitaires chez l'hôte [24, 25]. Toutefois, les différentes fonctions potentiellement associées à DAP12 chez les cellules NK et les cellules myéloïdes n'expliquent qu'en partie les effets observés chez ces souris déficientes. Entre autres, chez les macrophages péritonéaux DAP12<sup>-/-</sup> stimulés avec le LPS, la sécrétion de TNF- $\alpha$  et la production d'oxyde nitrique sont normales. De plus, DAP12 ne semble pas être requis pour la phagocytose de billes de latex non-opsonisées [24].

Par contre, le rôle de DAP12 dans la phagocytose via les récepteurs Fc $\gamma$ R n'a pas été étudié. La phagocytose est un processus essentiel pour la défense de l'hôte contre les infections et l'invasion par des microorganismes. La phagocytose via les Fc $\gamma$ R nécessite la reconnaissance des récepteurs par les immunoglobulines de type G, à la surface de la particule à ingérer. Cette liaison a pour effet d'agréger les Fc $\gamma$ R à la membrane et d'induire la phosphorylation de l'ITAM situé dans le domaine cytoplasmique du récepteur. Ces événements permettront le recrutement de la protéine tyrosine kinase Syk à l'ITAM, la formation d'une coupe d'actine au site d'ingestion, l'activation de cascades de signalisation intracellulaires, l'internalisation de la particule opsonisée et la maturation subséquente du phagosome [29-31].

L'objectif de mon projet de maîtrise consistait à étudier le rôle de DAP12 chez le macrophage. Nous avons choisi de cibler la phagocytose via les Fc $\gamma$ R. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé des macrophages de la lignée murine RAW 264.7 chez lesquels nous avons exprimé un mutant de DAP12 qui ne peut initier de cascades de signalisation via son ITAM. Les résultats obtenus lors des différentes expériences effectuées avec ces clones suggèrent que DAP12 serait impliqué dans la régulation négative de la phagocytose via les Fc $\gamma$ RI, vraisemblablement en modifiant la formation de coupes d'actine.

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# 1. DAP12

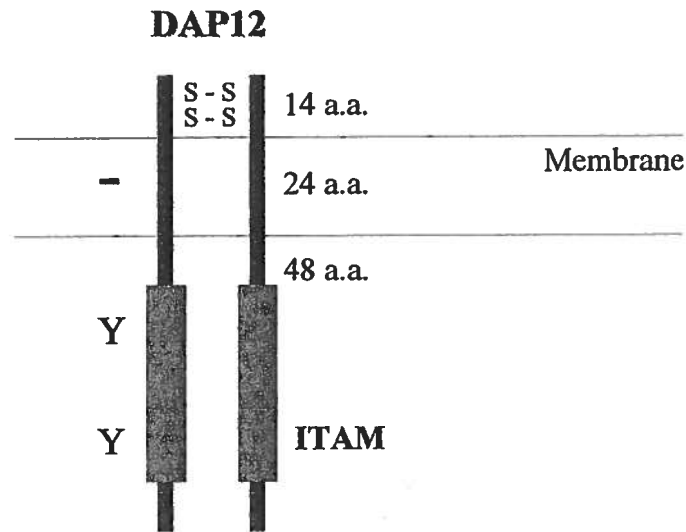
## 1.1 Découverte et description

Plusieurs groupes de chercheurs ont noté la présence d'une protéine de 12 à 16 kDa associée aux KAR (« Killer cell Activating Receptors ») chez les cellules NK [3, 11, 14]. Cette protéine, un homodimère dont les deux chaînes sont reliées par des ponts disulfures, peut être phosphorylée sur résidus tyrosine [2, 3, 11, 14].

Dans le but d'identifier cet homodimère, Lanier et ses collègues ont criblé une banque de données de séquences « EST » d'ADN complémentaire (ADNc). À travers ces séquences, ils recherchaient des molécules encore non identifiées homologues à la chaîne  $\gamma$  des récepteurs Fc ainsi qu'à la chaîne  $\zeta$  du TCR [1]. Ces nouvelles molécules devaient ainsi posséder dans leurs domaines cytoplasmiques au moins un motif ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif »), puisque l'on retrouve ces motifs à la fois dans la chaîne  $\gamma$  et dans la chaîne  $\zeta$ . Les ITAMs sont des séquences de 16 à 18 acides aminés, dont le consensus est  $Y_{X(2)}L_{X(6-8)}Y_{X(2)}L$ , conservées chez tous les polypeptides associés aux complexes TCR, BCR et Fc $\epsilon$ RI [32-34]. Un seul ITAM dans la portion intracytoplasmique de ces récepteurs est suffisant pour initier une cascade d'activation de la cellule [35]. De plus, les polypeptides comprenant ces ITAMs sont requis pour l'association de ces complexes de récepteurs dans le réticulum endoplasmique, via un résidu d'acide aminé chargé présent dans leur domaine transmembranaire [33, 34].

La molécule identifiée en 1998 par le groupe de Lanier a été nommée DAP12 (« DNAX-Activation Protein 12 ») en raison de son poids moléculaire de 12 kDa. C'est une

protéine transmembranaire de type I possédant une séquence signal de 27 a.a. ainsi qu'un domaine extracellulaire de 14 a.a., au sein duquel on retrouve deux résidus cystéine (voir figure A). Ceux-ci permettent à DAP12 de s'associer sous forme d'homodimère grâce à la formation de ponts disulfures [1].



**Figure A :** Structure de DAP12.

Le domaine transmembranaire de 24 a.a. de DAP12 contient un résidu acide aspartique, conférant une charge négative à la molécule. DAP12 doit donc s'associer de façon non covalente avec un récepteur comportant la charge opposée dans son domaine transmembranaire afin d'être exprimé à la surface. En l'absence d'un tel récepteur, DAP12 est retenu dans le réticulum endoplasmique [1]. Par conséquent, tous les récepteurs s'associant à DAP12 identifiés à ce jour possèdent un résidu lysine dans leurs domaines transmembranaires [6, 8, 10, 18, 20-22, 28, 36-39].

La protéine DAP12 peut être retrouvée en association avec différents récepteurs dans la même cellule. Certains ont même émis l'hypothèse que la présence de deux résidus acide aspartique dans chaque homodimère de la protéine DAP12 (un résidu dans chaque monomère) permettrait l'association simultanée de DAP12 avec deux récepteurs, que ces derniers soient identiques ou non [13]. DAP12 est essentiel pour l'expression adéquate à la surface des isoformes Ly49 et CD94/NKG2 et sa présence augmente l'expression membranaire des isoformes KIR. Par contre, bien que DAP12 ne puisse être exprimé seul à la surface, les isoformes KIR et le récepteur SIRP $\beta$ 1 peuvent être exprimés à la surface sans être associés à DAP12 lorsqu'ils sont surexprimés *in vitro* [1, 3, 4, 8, 11, 13]. La protéine DAP12 joue un rôle important dans la stabilité des récepteurs qui lui sont associés en permettant aux complexes DAP12/récepteurs d'échapper à la rétention dans le réticulum endoplasmique, évitant ainsi leur dégradation [40].

Au sein du domaine cytoplasmique de 48 a.a. de DAP12, on retrouve un motif ITAM qui confère à cette dernière les propriétés de molécule adaptatrice. En effet, c'est grâce aux résidus tyrosine phosphorylés de son ITAM que DAP12 recrute à la membrane les protéines participant à certaines cascades intracellulaires de signalisation [1].

Le clonage de l'ADNc murin de DAP12 par le groupe de Vivier a permis de montrer une homologie de 73.5 % entre les protéines DAP12 humaine et DAP12 murine [2].



## 1.2 Distribution

DAP12, en tant que sous-unité signalétique des KAR, semblait initialement exprimé uniquement chez les cellules NK. En effet, il n'était pas possible de détecter cette protéine en association avec les KAR lorsque l'on transfectait ces derniers dans une lignée de lymphocytes T ou de basophiles. De plus, ces mêmes KAR n'étaient pas capables d'initier des cascades d'activation cellulaire en l'absence de DAP12 [3, 11]. Par la suite, il a été démontré que la protéine DAP12 est exprimée chez les cellules dendritiques, les monocytes, les cellules NK et les macrophages, mais non chez les lymphocytes B et les lymphocytes T [1]. Il est ainsi possible de détecter la présence de DAP12 dans plusieurs tissus et organes. Chez la souris, c'est notamment le cas pour les poumons, le foie, le thymus, les ganglions lymphatiques, la rate et le péritoine. Par contre, la protéine DAP12 n'est pas exprimée dans le cerveau, les reins et les testicules [23].

## 1.3 Transduction des signaux via DAP12

DAP12 est une protéine activatrice des fonctions cellulaires [13]. L'agrégation des récepteurs associés à DAP12 induit la phosphorylation des deux résidus tyrosine de l'ITAM de DAP12 par les protéines tyrosine kinases (PTK) de la famille Src. Cette phosphorylation permet ensuite le recrutement des PTK ZAP70 et Syk [1, 3, 13]. Le recrutement et l'activation de Syk par DAP12 sont analogues au modèle de recrutement des PTK de la famille Syk par les chaînes accessoires des complexes TCR et BCR [1].

La PTK Syk, ainsi activée via DAP12, induit ensuite la phosphorylation sur résidus tyrosine et l'activation rapide de plusieurs autres protéines, incluant Cbl, PLC $\gamma$ 1 et PI 3-kinase [3-5, 13, 41]. Chez les cellules NK par exemple, cet événement se traduit ultérieurement par une production de TNF- $\alpha$ , une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK, une sécrétion de sérotonine, une mobilisation du calcium intracellulaire et une phosphorylation des MAPK [4, 39, 42]. L'élimination de l'un ou l'autre des résidus tyrosine de l'ITAM de DAP12 abolit la capacité de la protéine à transmettre un signal d'activation [2, 43-45].

## **2. Récepteurs activateurs : association avec DAP12 chez les cellules NK**

L'identité et les fonctions des récepteurs associés à DAP12 sont bien caractérisées chez les cellules NK. En effet, la majorité de ces récepteurs sont impliqués dans la lyse de cellules cibles et possèdent comme ligands les molécules classiques ou non-classiques du CMH de classe I [37, 46-49].

Parmi ces récepteurs associés à DAP12, on retrouve certaines molécules Ly49 murines (Ly49D, Ly49H, Ly49P et Ly49W)[17, 18, 39, 50-53], quelques récepteurs CD94/NKG2 humains et murins (NKG2C, D et E)[12, 41, 54, 55] et les KAR exprimés exclusivement chez l'humain [10, 36, 46, 56, 57]. Tous ces récepteurs possèdent des domaines extracellulaires presque identiques aux membres inhibiteurs de leur famille immédiate, mais différent de ceux-ci au niveau de leurs domaines cytoplasmiques. En effet, ils ne possèdent pas d'ITIM (« Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif ») et servent par conséquent à activer les propriétés cytotoxiques de la cellule NK.

### 3 Récepteurs associés à DAP12 chez les cellules myéloïdes

Les cellules myéloïdes sont des cellules progénitrices de la moelle osseuse qui se différencient par la suite en granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), en mastocytes ainsi qu'en monocytes et cellules dendritiques. Ces cellules myéloïdes jouent des rôles très variés autant dans l'immunité innée qu'acquise [58].

Chez les cellules myéloïdes, les divers récepteurs associés à DAP12 identifiés à ce jour font partie de la superfamille des lectines de type C ou la superfamille des immunoglobulines.

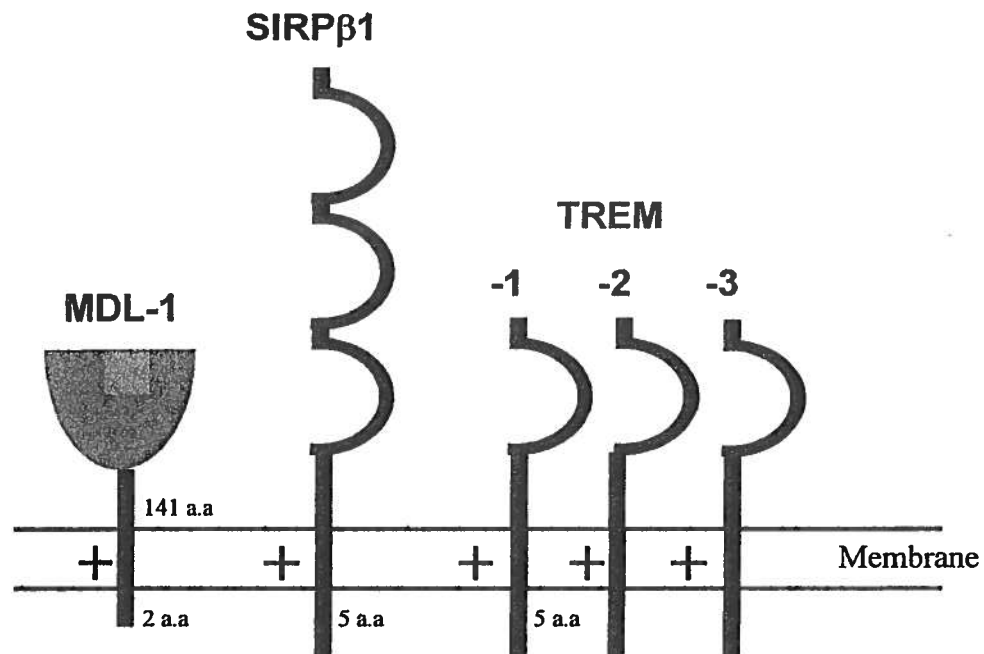
#### 3.1 Superfamille des lectines de type C

##### 3.1.1 MDL-1

MDL-1 est une lectine de type C clonée et caractérisée initialement chez l'humain. Cette glycoprotéine de type II a été identifiée grâce à sa capacité de permettre l'expression de DAP12 à la surface de la cellule lorsque transfectée de façon transitoire dans des cellules de rein humain (lignée 293T). MDL-1 possède un domaine extracellulaire de 141 a.a. ainsi qu'un domaine intracellulaire comprenant seulement 2 a.a., dépourvu de motifs de signalisation (voir figure B). La protéine MDL-1 murine est homologue à 69 % à la protéine MDL-1 humaine, contient 25 a.a. supplémentaires dans la partie proximale à la membrane de son domaine extracellulaire et un site de N-glycosylation additionnel [19].

MDL-1 est exprimé chez les cellules myéloïdes, d'où son nom « Myeloid DAP12-associating lectin-1 ». Cette protéine exprimée chez les monocytes et les macrophages n'a pas été détectée chez les lymphocytes B et T ainsi que chez les mastocytes. Aussi, lors de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, une forte diminution de la quantité d'ARNm de MDL-1 est observée. La protéine MDL-1 étant à ce jour l'unique membre de sa famille, on ne lui connaît pas de contrepartie inhibitrice [19].

Bien que le ligand de la protéine MDL-1 demeure inconnu, il est possible que ce soit une glycoprotéine membranaire ou un glycolipide puisque MDL-1 est une lectine. En l'absence de données sur l'identité de son ligand, le rôle joué par MDL-1 dans les fonctions des cellules myéloïdes demeure spéculatif. Ainsi, il a été suggéré que MDL-1 pourrait participer à l'activation pro-inflammatoire des cellules myéloïdes. En effet, le pontage des



**Figure B** : Structure des différents récepteurs associés à DAP12 exprimés chez les cellules myéloïdes.

complexes MDL-1/DAP12 à l'aide d'anticorps induit une activation de la cellule qui se traduit par une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, une flambée

oxidative, une production de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une augmentation de l'expression de molécules de costimulation [19].

## 3.2 Superfamille des immunoglobulines

### 3.2.1 SIRP $\beta$ 1

La protéine SIRP $\beta$ 1 (« Signal-Regulatory Protein- $\beta$ 1 ») comprend trois domaines Ig dans sa portion extracellulaire et est exprimée seulement chez l'humain. Ce récepteur représente la contrepartie activatrice du récepteur SIRP $\alpha$ , un récepteur exprimé chez les monocytes, macrophages, fibroblastes, neurones et mastocytes [8, 59-62]. SIRP $\alpha$  possède un domaine cytoplasmique de 110 à 113 a.a. comprenant deux à quatre séquences ITIM servant à recruter les PTP SHP-1 et SHP-2, tandis que SIRP $\beta$ 1 possède un domaine cytoplasmique de 5 a.a. dépourvu de motifs de signalisation intracellulaire (voir figure B) [8, 59, 63]. SIRP $\beta$ 1 s'associe avec DAP12 chez les monocytes et chez des cellules de reins d'embryons humains. Cette association de SIRP $\beta$ 1 avec DAP12 semble spécifique, puisque ce récepteur ne s'associe pas à la chaîne  $\gamma$  des récepteurs Fc [8].

Le ligand de SIRP $\alpha$ , ou CD47, est une molécule associée aux intégrines [64]. Il n'a pas encore été déterminé si SIRP $\beta$ 1 interagit avec le même ligand que SIRP $\alpha$ , mais la forte homologie entre les domaines extracellulaires de ces deux récepteurs le suggère, même si l'affinité de liaison pourrait différer. Le rôle joué par SIRP $\beta$ 1 demeure toutefois inconnu [8].

### 3.2.2 TREM-1

Le récepteur TREM-1 a été identifié d'abord chez l'humain, en recherchant des protéines homologues à NKp44 dans une banque d'ADNc [20]. NKp44 est une protéine d'environ 44 kDa qui est exprimée uniquement à la surface des cellules NK activées. Le récepteur NKp44 comprend un seul domaine Ig dans sa portion extracellulaire, s'associe avec DAP12 et sert à activer la cellule, ceci malgré la présence d'un ITIM dans son domaine cytoplasmique. Le ligand de NKp44 demeure inconnu, mais ce récepteur est impliqué dans l'activation des propriétés cytolytiques des cellules NK par un processus indépendant de la reconnaissance des molécules du CMH de classe I [6, 38].

TREM-1 est une glycoprotéine de 26 kDa (lorsque déglycosylée) comprenant un seul domaine Ig dans sa portion extracellulaire et une portion cytoplasmique de 5 a.a. dépourvue de motifs de signalisation (voir figure B) [20]. On retrouve TREM-1 chez les monocytes et les neutrophiles, mais non chez les lymphocytes et autres types cellulaires, d'où le nom de TREM pour « Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells » [20].

Le récepteur TREM-1 s'associe à DAP12 et le pontage de ces complexes à l'aide d'anticorps active les monocytes et les neutrophiles. Le signal généré par TREM-1 est suivi d'une augmentation rapide de la concentration de calcium intracellulaire ainsi que d'une phosphorylation sur résidus tyrosine de plusieurs protéines intracellulaires, dont ERK1, ERK2 et PLC- $\gamma$ . L'activation de la cellule via TREM-1 mène à la sécrétion de divers médiateurs solubles tels l'IL-8, le MCP-1, le MPO ainsi que le TNF- $\alpha$  et augmente l'expression de plusieurs molécules d'adhésion et de costimulation à la surface de la cellule [20].

La stimulation de la cellule par des bactéries, des acides lipoteichoïques ou le LPS a pour effet d'augmenter l'expression de TREM-1 à la surface de la cellule. Dans ces mêmes conditions de stimulation, les réponses cellulaires dépendantes de TREM-1 sont aussi accentuées [20, 26]. Une étude portant sur les macrophages de la lignée MT2, une lignée d'origine thymique dérivée de la souris BALB/c et exprimant TREM-1, a permis de déterminer que cette modulation de l'expression de TREM-1 à la surface de la cellule par le LPS est post-translationnelle. Par contre, lors de la stimulation de ces mêmes macrophages avec l'IFN- $\gamma$ , l'effet contraire est observé. En effet, dans ces conditions expérimentales, la quantité d'ARNm de TREM-1 détectée chez ces macrophages est réduite [22]. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors de l'expression de DAP12 à la membrane et le pontage de la protéine à la suite d'une stimulation de la cellule au LPS [23, 45].

TREM-1 joue un rôle prédominant dans le processus inflammatoire, en activant les monocytes et les neutrophiles et en participant à leur migration aux sites d'infection [20, 26]. La signalisation via les complexes TREM-1/DAP12 sert aussi à amplifier les réponses cellulaires vis-à-vis des produits microbiens. Ceci a été entre autres démontré lors de l'injection de souris avec des protéines de fusion comprenant le domaine extracellulaire de TREM-1 couplé à la portion Fc des IgG1. Cette injection cause une compétition entre la protéine de fusion et le récepteur TREM-1 membranaire pour le même ligand et élimine de plus une certaine quantité de ce ligand (liée par TREM-1/Fc) de la circulation grâce à la portion Fc de la protéine de fusion. Les souris ainsi traitées étaient davantage protégées contre un choc endotoxique expérimental, une septicémie ou un choc septique [26]. Les interactions entre l'ITAM de DAP12 et les différentes molécules impliquées dans les cascades intracellulaires enclenchées par le LPS demeurent inconnues pour l'instant [27].

### 3.2.3 TREM-2

TREM-2 est une glycoprotéine d'environ 40 kDa possédant un seul domaine Ig dans sa portion extracellulaire (voir figure B). Elle a été identifiée chez l'humain par homologie à TREM-1 [20, 28]. La protéine TREM-2 est exprimée chez les macrophages et les cellules dendritiques, mais non chez les monocytes et les granulocytes. Ce patron d'expression a mené le groupe de Colonna à suggérer que ce récepteur serait impliqué dans le processus inflammatoire chronique [20].

Chez l'humain, TREM-2 est l'unique membre de sa famille. Ce n'est pas le cas chez la souris, puisque les cellules myéloïdes de souris BALB/c expriment deux récepteurs TREM-2 hautement homologues : TREM-2a et TREM-2b. Ces deux homologues diffèrent de 6 nucléotides, ce qui se traduit par une différence de 3 acides aminés dans leurs domaines extracellulaires. La lignée de macrophages RAW 264.7, dérivée à partir de macrophages péritonéaux de souris BALB/c, n'exprime que TREM-2b [21]. Il est impossible, dans l'état actuel des choses, de prédire si la différence de 3 a.a. entre les domaines extracellulaires de TREM-2a et TREM-2b a une influence sur la reconnaissance de leur(s) ligand(s) [21].

Chez l'humain, la protéine TREM-2 n'est pas exprimée à la surface des monocytes, mais l'est chez les monocytes différenciés en cellules dendritiques immatures. Lors d'une induction de la maturation de ces cellules dendritiques par une stimulation au LPS, TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ , TREM-2 disparaît de la surface cellulaire. Le pontage par anticorps des complexes TREM-2/DAP12 à la surface des cellules dendritiques immatures cause une augmentation rapide de la concentration de calcium intracellulaire et la phosphorylation sur résidus tyrosines de plusieurs protéines intracellulaires, dont ERK1/2. L'expression à la surface de plusieurs



récepteurs tels le CCR7, les CMH de classe II, le CD86 et le CD40 est aussi augmentée en réponse à une activation via TREM-2/DAP12. Cette signalisation n'induit toutefois pas l'activation d' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ , de p38 et SAPK ainsi que la sécrétion de cytokines [28].

L'activation de ERK1/2 via les complexes TREM-2/DAP12 exprimés à la surface des cellules dendritiques immatures augmente le temps de survie de celles-ci lorsqu'elles sont privées d'IL-4 ou de GM-CSF. De plus, lors du pontage de TREM-2/DAP12 à l'aide d'anticorps, on observe chez ces cellules une amplification de leurs capacités d'activation, de migration, de présentation d'antigène et de stimulation des cellules T. La maturation des cellules dendritiques induite par la signalisation via TREM-2/DAP12 est similaire à celle initiée par la signalisation via les FcR. Il a d'ailleurs été proposé qu'une des fonctions de TREM-2 serait d'amplifier les cascades de maturation enclenchées par d'autres récepteurs [28].

Chez la souris, la protéine TREM-2 est exprimée de façon constitutive à la surface des monocytes. Ce niveau d'expression, qui pourrait par contre varier en fonction du type cellulaire, augmente légèrement à la suite de la stimulation de la cellule par le LPS [45]. Le pontage des complexes TREM-2/DAP12 mène à l'activation de la cellule et à la sécrétion de NO [21]. Il a été suggéré que cette sécrétion de NO pourrait faire pencher la balance d'une réponse immunitaire de type Th1 vers une réponse immunitaire de type Th2 [21]. Puisque TREM-2 peut être détecté à la surface de la cellule plus tôt que TREM-1, ceci remet en doute l'hypothèse selon laquelle TREM-1 participerait à la réponse immunitaire aiguë, et TREM-2 à celle chronique [45].

### 3.2.4 TREM-3, TREM-4 et TREM-5

Le récepteur TREM-3 a été identifié chez la souris par homologie de séquence avec le domaine extracellulaire de TREM-2. Le gène codant pour TREM-3 est adjacent à ceux codant pour TREM-1 et TREM-2, ainsi qu'à ceux codant pour deux gènes homologues à TREM-1 : TREM-4 et TREM-5. TREM-4 et TREM-5 possèdent 85 % d'homologie avec TREM-1 au niveau de leurs domaines transmembranaires et cytoplasmiques. La proximité de ces gènes sur le chromosome 17 murin suggère la présence à cet endroit d'un complexe de gènes codant pour des récepteurs spécifiquement requis lors des réponses immunitaires innées [22].

La protéine TREM-3 est exprimée chez les lignées de macrophages murins RAW 264.7 et MT2, mais non chez la lignée de macrophages P388D1. Des transcrits de TREM-3 sont aussi détectés chez des lymphomes T, mais non chez les cellules NK activées, les myélomes de lymphocytes B et les monocytes humains. Le pontage par anticorps des complexes TREM-3/DAP12 induit une activation de la cellule [22].

Tel TREM-1, l'expression à la surface de TREM-3 chez les macrophages est régulée à la hausse par le LPS et la présence d'ARNm de TREM-3 est régulée à la baisse par l'IFN- $\gamma$ . Il a été proposé que ce mode de régulation par le LPS permettrait une expression élevée de TREM-3 tôt dans l'infection de la cellule par des bactéries. La régulation par l'IFN- $\gamma$  servirait ensuite à diminuer la présence de TREM-3 à la surface de la cellule plus tard dans l'évolution du processus inflammatoire. Une autre hypothèse suggère que l'expression de TREM-1 et TREM-3 pourrait être augmentée lors d'infections par des microorganismes capables d'inhiber les réponses enclenchées par l'IFN- $\gamma$  [22].

#### 4 DAP12 : une molécule multifonctionnelle

Comme déjà mentionné, la chaîne  $\zeta$  du TCR, la chaîne  $\gamma$  du récepteur Fc et DAP12 possèdent une importante similarité structurale. Les trois protéines comprennent un ITAM, un domaine extracellulaire court et un résidu transmembranaire acide, suggérant qu'elles pourraient toutes trois remplir le même rôle. La raison pour laquelle plusieurs récepteurs ne s'associent qu'à DAP12 demeure inconnue. En effet, chez des souris déficientes pour DAP12, les récepteurs Ly49D et Ly49H sont pratiquement absents de la surface des cellules NK, malgré la présence de la chaîne  $\gamma$  chez ces cellules [24]. De plus, il n'a jamais été démontré que les KAR peuvent s'associer avec une molécule autre que DAP12 afin d'activer la cellule [1]. Une pression évolutive a certainement dû être exercée de façon à assigner un rôle unique pour DAP12 dans les cellules NK. Ce rôle unique demeure présentement obscur, mais l'association sélective avec Syk plutôt qu'avec ZAP70 suggère que la signalisation via l'ITAM de DAP12 pourrait différer des voies de signalisation dépendantes des chaînes FcR $\gamma$  et TCR $\zeta$  [5].

Dans une cellule, la protéine DAP12 s'associe simultanément avec différents récepteurs ainsi qu'avec des récepteurs qui varient d'une population cellulaire à une autre. Il est donc raisonnable de penser que DAP12 est une molécule multifonctionnelle, puisque le rôle de DAP12 dépend à la fois de tous ces récepteurs, ainsi que de la nature des ligands de ceux-ci. Dans ces conditions, des humains et des souris n'exprimant pas DAP12 s'avèrent de précieux outils pour l'identification des fonctions associées à cette protéine.

## 4.1 La souris déficiente en DAP12

Deux stratégies distinctes ont été employées pour générer des souris déficientes pour DAP12. Lanier et ses collaborateurs ont procédé par la délétion d'exons codant pour les domaines transmembranaire et cytoplasmique de la protéine DAP12 (souris DAP12<sup>-/-</sup>) [24]. Vivier et ses collègues ont plutôt procédé par l'insertion d'une mutation dans le domaine cytoplasmique de DAP12. Cette mutation provoque la perte du deuxième résidu tyrosine de l'ITAM de DAP12 ainsi que des acides aminés suivants (souris DAP12<sup>KΔ275/KΔ275</sup>). Bien qu'elle soit exprimée à la surface, la signalisation via cette protéine DAP12 est abolie [25].

Dans les deux cas, les souriceaux sont viables, croissent normalement et sont fertiles. De plus, leurs cellules hématopoïétiques se développent normalement. La protéine DAP12 ne semble donc pas être requise pour la maturation des cellules NK puisque le nombre total de ces cellules dans la rate n'est pas affecté chez ces deux types de souris [24, 25].

Les cellules NK chez les souris DAP12<sup>-/-</sup> expriment à leur surface des niveaux à peine détectables du récepteur Ly49D et n'expriment pratiquement pas Ly49H [24]. De plus, les récepteurs Ly49D/H présents à la surface des cellules NK provenant des souris DAP12<sup>-/-</sup> et DAP12<sup>KΔ275/KΔ275</sup> sont très instables et incapables d'initier des cascades de signalisation. Ceci signifie que l'absence de DAP12 chez ces cellules NK ne peut pas être compensée par la présence de la chaîne  $\gamma$  des récepteurs Fc. Il a également été observé que la protéine DAP12 n'est pas essentielle pour la lyse de nombreuses lignées de cellules tumorales par les cellules

NK. En effet, la cytotoxicité envers certaines lignées n'est pas affectée chez les souris DAP12<sup>-/-</sup> ni chez les souris DAP12<sup>KΔ275/KΔ275</sup> [24, 25].

Les cellules myéloïdes déficientes en DAP12 (granulocytes, macrophages et cellules dendritiques) semblent normales. Les macrophages DAP12<sup>-/-</sup> stimulés au LPS sécrètent des niveaux de TNF-α et de NO comparables à ceux sécrétés par la souris sauvage et phagocytent des billes de latex avec la même efficacité que les macrophages exprimant une protéine DAP12 non mutée. Par contre, on remarque une accumulation de cellules dendritiques exprimant les molécules du CMH de classe II dans le derme de la peau des souris DAP12<sup>-/-</sup> [24]. Ceci est aussi le cas chez les souris DAP12<sup>KΔ275/KΔ275</sup>, chez lesquelles on note aussi une accumulation importante de cellules CD11c<sup>+</sup> et CMH II<sup>+</sup> à morphologie dendritique dans la muqueuse intestinale et dans la muqueuse buccale. Ces cellules peuvent être des cellules dendritiques myéloïdes, ou encore des monocytes ou macrophages activés qui envahissent le derme à partir du flot sanguin et vont se différencier en cellules dendritiques. Il a ainsi été suggéré que DAP12 serait impliqué dans la différenciation et les cascades d'activation des cellules dendritiques myéloïdes et des cellules prédendritiques présentes dans l'épithélium [25]. DAP12 serait aussi important pour la viabilité des monocytes, participerait à la différenciation de ceux-ci en macrophages et serait impliqué dans les cascades menant à l'apoptose de la cellule [45].

La protéine DAP12 serait également impliquée dans la réponse des cellules dendritiques aux différentes chemokines produites par l'épithélium mucocutané [25]. En effet, l'absence de signalisation lors de l'engagement des complexes TREM-2/DAP12 à la membrane diminuerait le niveau d'expression des récepteurs CCR7 à la surface de la cellule

dendritique. Ceci affecterait la migration de ces cellules vers les ganglions lymphatiques. La diminution de l'expression de CCR7 à la membrane nuirait aussi à l'expression adéquate des molécules de surface nécessaires pour la stimulation appropriée des cellules T par les cellules dendritiques [28].

Dans un modèle expérimental d'encéphalomyélite sévère, alors que 100% des souris hétérozygotes DAP12<sup>+/-</sup> développent la maladie, 30 % des souris déficientes en DAP12 sont résistantes à celle-ci et la majorité des souris DAP12<sup>-/-</sup> atteintes manifestent des symptômes très atténués. Chez les souris DAP12<sup>+/-</sup> atteintes, une importante infiltration de leukocytes est observée dans la moelle épinière et le parenchyme du système nerveux central est envahi par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup>. Par contre, chez les souris DAP12<sup>-/-</sup> atteintes, seuls quelques macrophages infiltrent la moelle épinière. Ces symptômes atténués chez les souris DAP12<sup>-/-</sup> sont dus à une absence de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la conséquence d'une stimulation inadéquate de ces cellules par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) DAP12<sup>-/-</sup> [24]. En plus des lymphocytes CD4<sup>+</sup>, les CPA DAP12<sup>K $\Delta$ 275/K $\Delta$ 275</sup>, sont incapables d'activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. En effet, lorsque l'on applique, chez les souris DAP12<sup>K $\Delta$ 275/K $\Delta$ 275</sup>, du DNFB (2,4-dinitrofluoro-benzène) sur la peau afin d'initier un processus inflammatoire en fonction de l'activation des lymphocytes T, on observe une réponse immunitaire sévèrement inhibée [25]. Cette inaptitude à stimuler les lymphocytes T pourrait découler d'un défaut dans l'activation initiale des CPA DAP12<sup>-/-</sup> et DAP12<sup>K $\Delta$ 275/K $\Delta$ 275</sup>. Cette inaptitude pourrait également être la conséquence d'une diminution des capacités de migration de ces CPA, que ce soit vers le site initial de rencontre avec

l'antigène ou vers les ganglions lymphatiques pour la présentation de l'antigène aux lymphocytes T [24, 25].

Chez l'homme, l'absence de la protéine DAP12 est à l'origine de la maladie Nasu-Hakola [65, 66]. Cette maladie a été diagnostiquée au début des années soixante-dix par deux groupes de chercheurs indépendants, l'un travaillant avec des patients originaires de la Finlande et l'autre avec des patients Japonais [67-69]. La maladie Nasu-Hakola est caractérisée par l'apparition de kystes osseux aux poignets et aux chevilles vers la vingtaine ou la trentaine, suivi d'une progression rapide de plusieurs symptômes psychotiques. La mort prématurée du patient survient habituellement avant la cinquantaine [68-76]. Il est intéressant de noter que chez les patients atteints, l'absence de DAP12 n'affecte ni le nombre, ni les capacités cytotoxiques des cellules NK. Ceci signifie que les cellules NK fonctionnent normalement en l'absence de DAP12 [66]. Par conséquent, il a été proposé que l'effet pathologique observé chez les patients serait plutôt la conséquence de l'absence de DAP12 dans les cellules myéloïdes. En effet, les microglies présentes dans le système nerveux central et les ostéoclastes responsables de la résorption des os se différencient à partir de monocytes et macrophages [66, 76]. Des expériences permettant de déterminer si l'absence de DAP12 chez la souris adulte cause les mêmes symptômes que ceux observés chez les patients atteints de la maladie Nasu-Hakola sont présentement en cours [24].

## 5 Le macrophage

### 5.1 Définition et description

Le macrophage est une cellule phagocytaire professionnelle caractérisée par sa grande taille (25 à 50  $\mu\text{m}$ ) et son noyau non polymorphe. Elle est la forme mature et tissulaire obtenue en réponse à la différenciation dans la moelle osseuse des monoblastes en promonocytes puis en monocytes. Lorsque les monocytes se retrouvent dans le système sanguin, divers stimuli (cytokines, chemokines) peuvent augmenter l'expression de molécules d'adhésion à leur surface. Ils acquièrent ainsi la capacité de migrer hors des vaisseaux sanguins afin d'atteindre les tissus et les sites d'inflammation. Le macrophage tissulaire au repos sera ensuite activé lors du processus inflammatoire, notamment par des microorganismes et par les lymphocytes  $\text{CD4}^+$ , ce qui augmentera considérablement ses capacités chemotactiques et phagocytaires [77, 78].

### 5.2 Rôle du macrophage

Le macrophage joue un rôle important au niveau des réponses immunitaires innées et acquises. Avec les neutrophiles, ce sont les premiers à réagir lors de l'invasion de l'hôte par des microorganismes, en les phagocytant. Ceci constitue une des fonctions majeures de ces cellules. Lorsqu'ils sont activés, les macrophages possèdent aussi la capacité de sécréter plusieurs médiateurs solubles, tels le lysozyme, le NO, les métalloprotéases ainsi que diverses cytokines pro-inflammatoires. Grâce à ces médiateurs, ils recrutent au site d'inflammation et



régulent l'activité de plusieurs autres cellules du système immunitaire. Les macrophages s'avèrent également des CPA professionnelles. En effet, la présence de molécules du CMH de classe II à leur surface leur permet de présenter les peptides qu'ils ont ingérés et dégradés aux différentes cellules qu'ils recrutent au site d'inflammation [77, 78].

Les macrophages participent à plusieurs activités physiologiques cruciales, grâce à leur capacité à phagocyter et débarrasser l'hôte de ses cellules sénescentes, synthétiser des acides gras et participer à la synthèse de corticostéroïdes. Ils servent aussi à éliminer les particules opsonisées par les anticorps produits par l'hôte, en les phagocytant via leurs récepteurs Fc. [77, 78].

### 5.3 Récepteurs du macrophage : les récepteurs Fc

Parmi les nombreux récepteurs présents à la surface du macrophage, on retrouve les récepteurs impliqués dans la phagocytose. Ceux-ci comprennent les récepteurs du complément, le récepteur mannose/fucose, les récepteurs « scavenger » et les FcR [30]. Notre attention sera portée plus particulièrement vers ces derniers.

Les anticorps sont les médiateurs entre l'immunité innée et adaptative : ils reconnaissent leurs ligands de façon très spécifique, mais ils sont liés et internalisés via des récepteurs pour leurs domaines Fc (FcR). Ces FcR peuvent être membranaires ou solubles, et font habituellement partie de la superfamille des immunoglobulines. On retrouve des FcR spécifiques pour chacun des isotypes d'immunoglobulines : les IgA sont reconnues par les Fc $\alpha$ R, les IgE par les Fc $\epsilon$ R, les IgM par les Fc $\mu$ R, les IgD par les Fc $\delta$ R et les IgG par les Fc $\gamma$ R [79].

Il y a deux classes générales de récepteurs Fc : ceux impliqués dans les fonctions effectrices de la cellule et ceux qui transportent les Ig à travers certaines membranes épithéliales. Les Fc $\gamma$ R font partie de la première catégorie. D'un point de vue fonctionnel, les FcR membranaires de la superfamille des Ig (tels les Fc $\gamma$ R) peuvent être subdivisés en deux types majeurs : les FcR activateurs et les FcR inhibiteurs [79].

Les FcR activateurs possèdent des motifs ITAM [80]. Ces motifs peuvent faire partie intégrante du domaine intracellulaire de la chaîne  $\alpha$  du FcR (FcR $\alpha$ , la chaîne qui reconnaît le ligand), ou bien être compris dans une chaîne associée à FcR $\alpha$ , la chaîne  $\gamma$  [79, 81, 82]. En effet, la chaîne FcR $\gamma$ , ainsi que la chaîne TCR $\zeta$  qui lui est homologue, comprennent toutes les deux des ITAMs et forment habituellement des homodimères, bien que des hétérodimères  $\gamma$ - $\zeta$  soient possibles. Quant aux FcR inhibiteurs, ils possèdent un ITIM dans le domaine intracellulaire de la chaîne FcR $\alpha$ . Ce motif leur permet d'inhiber l'activation de la cellule induite par les FcR activateurs [79].

Afin de générer un signal, les FcR doivent être agrégés à la surface de la cellule. Cette agrégation peut avoir lieu lorsque le récepteur interagit avec des Ig monomériques non complexées à des antigènes, mais seulement si le FcR est de haute affinité. L'agrégation des FcR de faible affinité n'aura lieu que lorsque ceux-ci se lieront à des complexes immuns (Ig agrégées ou liées à un antigène). Par convention, l'on nomme les FcR de haute affinité FcRI, et ceux de faible affinité FcRII et FcRIII [79].

### 5.3.1 FcγR : définition générale

Ce sont des récepteurs membranaires de la superfamille des Ig, subdivisés en trois groupes : FcγRI, FcγRII et FcγRIII. Ces récepteurs sont impliqués dans la phagocytose de particules opsonisées par des IgG. L'endocytose de complexes immuns solubles via les FcγR peut avoir lieu dans toute cellule exprimant ces récepteurs à leur surface. Par contre, seuls les phagocytes professionnels peuvent phagocyter via ces récepteurs [79].

Les FcγR n'étant pas exprimés de façon clonale, la plupart des cellules qui les expriment possèdent un mélange de ces récepteurs à leur surface. Il est donc plausible de croire que lors de l'agrégation de ces récepteurs, plusieurs FcγR différents seront impliqués, avec des effets qui peuvent être positifs ou négatifs. Par exemple, la co-agrégation de deux FcγR activateurs peut mener à leur transphosphorylation, ce qui augmente l'efficacité du signal positif. À l'inverse, l'agrégation d'un FcγR activateur avec un FcγR inhibiteur mène à l'inhibition de ce signal activateur [79].

### 5.3.2 FcγRI (ou CD64)

Ce sont des protéines d'environ 72 kDa. Il existe trois gènes codant pour ce récepteur chez l'humain (A, B et C), mais seule la protéine FcγRIA est transmembranaire [83]. En revanche, un seul gène codant pour FcγRI est présent chez la souris, soit l'homologue du récepteur FcγRIA humain [79].

On retrouve ces récepteurs à la surface des monocytes, macrophages, neutrophiles et éosinophiles stimulés par l'IFN- $\gamma$  [83, 84]. L'expression membranaire de Fc $\gamma$ RI peut être modulée par l'IFN- $\gamma$ , le G-CSF, le GM-CSF, les glucocorticoïdes et le C5a [83]. L'agrégation de Fc $\gamma$ RI induit une production d'anions superoxydes et une sécrétion de TNF- $\alpha$  [85, 86].

Fc $\gamma$ RI est le seul Fc $\gamma$ R possédant trois domaines apparentés aux Ig dans sa portion extracellulaire. Ceci contribue en partie à lui conférer une haute affinité de liaison aux IgG

Récepteur Fc	Affinité pour le ligand
Fc $\gamma$ RI	IgG2a > IgG3 > IgG1 = IgG2b
Fc $\gamma$ RII	IgG1 > IgG2a = IgG2b
Fc $\gamma$ RIII	IgG1 = IgG2a > IgG2b

**Tableau A :** Affinité préférentielle des Fc $\gamma$ R murins pour les différentes immunoglobulines de type G.

(voir Tableau A) [79, 83]. L'association de Fc $\gamma$ RI avec la chaîne Fc $\gamma$ R $\gamma$  augmente également l'efficacité de liaison du récepteur avec son ligand. Il est intéressant de noter que bien que dans un système de surexpression *in vitro* l'expression de Fc $\gamma$ RI à la membrane soit possible sans son association avec la chaîne Fc $\gamma$ R $\gamma$ , les cellules de souris déficientes pour la chaîne Fc $\gamma$ R $\gamma$  n'expriment pas Fc $\gamma$ RI à leur surface [87-89].

### 5.3.3 Fc $\gamma$ RII (ou CD32)

Les membres de ce groupe possèdent tous leurs motifs de signalisation dans le domaine cytoplasmique de leur chaîne  $\alpha$ . Trois formes du récepteur Fc $\gamma$ RII sont connues : Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB et Fc $\gamma$ RIIC [79].

FcγRIIA et FcγRIIC sont des formes activatrices puisqu'elles comprennent chacune deux ITAMs. Elles sont exprimées principalement à la surface des macrophages, et ce, uniquement chez l'humain. L'agrégation de FcγRIIA et FcγRIIC active les macrophages et induit la sécrétion d'anions superoxydes et de TNF-α [79, 83, 86].

Quant au récepteur FcγRIIB, la présence d'un ITIM dans sa partie cytoplasmique lui confère des propriétés inhibitrices. Il existe plusieurs isoformes de FcγRIIB qui sont exprimés à des niveaux différents d'un type cellulaire à un autre. Par exemple, on retrouve FcγRIIB1 majoritairement à la surface des cellules lymphoïdes et FcγRIIB2 surtout à la surface des cellules myéloïdes. La souris exprime en plus un troisième isoforme, soit FcγRIIB1'. Ce récepteur est l'homologue de FcγRIIB1 humain et il est exprimé à la fois à la surface des cellules lymphoïdes et myéloïdes [79].

Le récepteur FcγRIIB2 permet l'endocytose de complexes immuns solubles. À la suite de cet événement, la cellule sera en mesure de présenter plus efficacement, via ses molécules du CMH de classe I, les antigènes internalisés [79]. Par contre, la phagocytose peut avoir lieu seulement via l'isoforme murin de FcγRIIB2. Ceci est possible grâce à la présence chez celui-ci d'un résidu tyrosine additionnel dans sa portion C-terminale [79, 90].

#### 5.3.4 FcγRIII (ou CD16)

On retrouve deux gènes pour ce récepteur, codant pour deux protéines : FcγRIIIA et FcγRIIIB [79].

FcγRIIIA est une protéine transmembranaire que l'on retrouve à la surface des monocytes, macrophages, cellules NK et cellules T  $\gamma/\delta$ . Ne possédant pas de motifs de signalisation, FcγRIIIA s'associe avec la chaîne FcR $\gamma$  (ou la chaîne TCR $\zeta$  chez les cellules NK humaines) afin d'initier un signal activateur. Quant au récepteur FcγRIIIB, il n'est présent que chez les neutrophiles et éosinophiles humains. Ce récepteur est ancré à la membrane par un lien GPI (glycosylphosphatidylinositol) et ne contient aucun motif de signalisation. Il peut toutefois s'associer à d'autres FcγR et contribuer à leur capacité à activer des voies de signalisation [79, 83].

Le niveau d'expression des récepteurs FcγRIII à la surface des monocytes peut être modulé par le TGF- $\beta$ . Chez les neutrophiles humains, ceci se produit lors de la stimulation par l'IFN- $\gamma$ , le G-CSF et le GM-CSF [83].

L'agrégation des récepteurs FcγRIIIA à la membrane induit la phagocytose chez les macrophages, l'ADCC de cellules tumorales chez les cellules NK et chez les neutrophiles ainsi que l'élimination des complexes immuns de la circulation sanguine [79, 83].

## **6 Phagocytose via les FcγR**

La reconnaissance par les FcγR de particules opsonisées avec des IgG provoque une agrégation de ces récepteurs, une extension de pseudopodes, une activation des cascades de signalisation intracellulaire, une polymérisation de la F-actine au site d'ingestion, une internalisation de la particule et une fusion éventuelle du phagosome ainsi formé avec le

système endosomal [29-31]. La phagocytose via les Fc $\gamma$ R est un processus complexe régulé par un équilibre entre des signaux activateurs et inhibiteurs.

### 6.1 Reconnaissance du ligand et agrégation des Fc $\gamma$ R

La reconnaissance de leurs ligands par les Fc $\gamma$ R s'effectue via l'interaction des domaines extracellulaires de ces récepteurs avec les opsonines à la surface de la particule à ingérer [30]. Bien que la haute affinité de Fc $\gamma$ RI pour son ligand soit habituellement attribuée à la présence du troisième domaine Ig dans sa portion extracellulaire, l'association avec la chaîne  $\gamma$  sert probablement à modifier la structure quaternaire du récepteur et augmente son affinité de liaison. La reconnaissance efficace du ligand dépend donc à la fois du domaine extracellulaire et des domaines cytoplasmiques du récepteur [79, 87, 89, 91].

L'événement le plus précoce lors de la phagocytose via les Fc $\gamma$ R est l'agrégation des récepteurs à la surface de la cellule. Il est généralement accepté que cette agrégation n'est pas le résultat d'un signal spécifique, mais plutôt la conséquence d'une diffusion des récepteurs dans la membrane. Par contre, il a été démontré que l'inhibition de RhoA, une petite GTPase, empêche partiellement l'attachement des particules aux Fc $\gamma$ R et diminue la mobilité de ces récepteurs dans la membrane [92]. Cet effet est probablement dû à une implication de Rho lors la signalisation via des intégrines, événement jugé nécessaire à la phagocytose [93, 94]. De même, une inhibition de la petite GTPase ARF6 inhibe, mais n'abolit pas, l'attachement des particules opsonisées aux Fc $\gamma$ R. En effet, selon le rôle qui a été proposé pour ARF6, cette

protéine servirait à recruter à la membrane de nouvelles protéines effectrices et autres composantes nécessaires au bon déroulement du processus phagocytaire [95].

## 6.2 Transduction des signaux

Le domaine extracellulaire de FcγRI est suffisant pour initier l'endocytose de petites particules opsonisées. Par contre, la phagocytose de ces particules grâce à un mécanisme reposant sur la polymérisation de l'actine nécessite la présence d'un ITAM dans le domaine

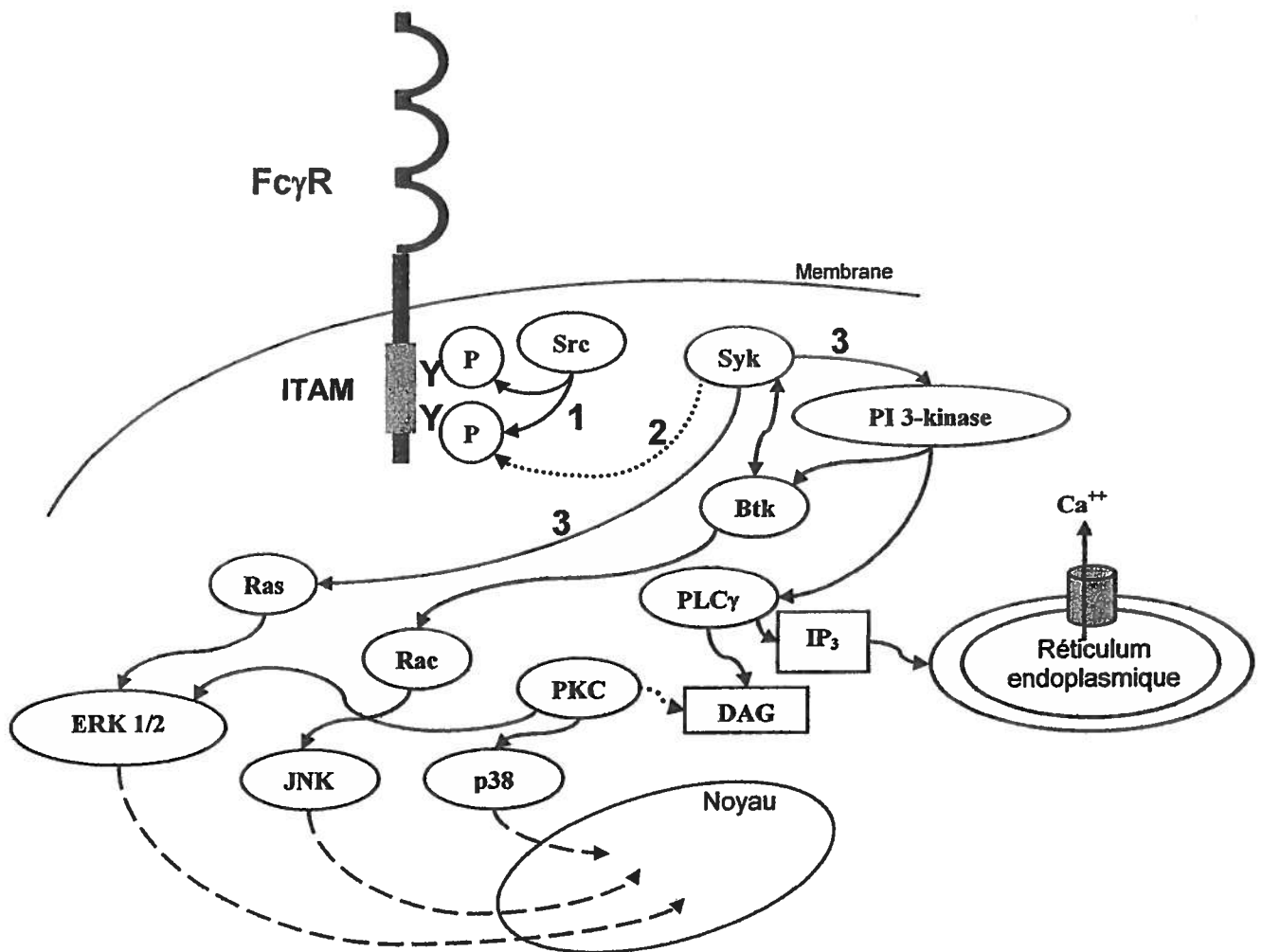


Figure C : Signalisation via les FcγR (adapté de [31]).



intracellulaire du récepteur [96]. Suite à l'agrégation des Fc $\gamma$ R, ces ITAMs seront phosphorylés (voir figure C, étape 1). Les PTK impliquées n'ont pas été formellement identifiées jusqu'à présent, mais les PTK de la famille Src représentent de bons candidats [79, 97]. Ces dernières sont localisées à la membrane et ne sont pas nécessairement associées directement avec les FcR [98].

Certes, les PTK de la famille Src sont impliquées dans la phagocytose via les Fc $\gamma$ R et leur présence sert à amplifier grandement ce processus [97, 99]. En effet, chez des souris Hck<sup>-/-</sup>/Fgr<sup>-/-</sup>/Lyn<sup>-/-</sup>, la formation de coupes d'actine, la phosphorylation de la chaîne  $\gamma$  des FcR et l'activation de Syk et PI 3-kinase lors de la phagocytose via les Fc $\gamma$ R sont très limitées et retardées, mais ne sont toutefois pas abolies. Cependant, puisqu'il est possible que des PTK de la famille Src autres que Hck, Fgr et Lyn puissent initier la phagocytose via les Fc $\gamma$ R dans ce modèle, il est impossible suite à cette étude d'affirmer avec certitude que les PTK de la famille Src ne sont pas essentielles pour la phagocytose via les Fc $\gamma$ R [99]. Des études portant sur la PTK Csk ont par contre souligné la nécessité des PTK de la famille Src dans la phagocytose via les Fc $\gamma$ R. La PTK Csk sert à phosphoryler le résidu tyrosine en position C-terminale des PTK de la famille Src, ce qui les rend inactives [100]. Chez des macrophages de la lignée RAW 264.7 surexprimant une Csk constitutivement active, la phagocytose est abolie. Ces études ont aussi permis de démontrer que les PTK de la famille Src sont impliquées à différents degrés dans l'initiation des cascades intracellulaires menant à la phagocytose. En effet, chez ces mêmes cellules exprimant une PTK Csk constitutivement active, l'introduction de formes constitutivement actives des PTK Lyn et Hck, mais non de la PTK Src, restaure la capacité de la cellule à phagocyter via les Fc $\gamma$ R [97].

La phosphorylation de l'ITAM du récepteur FcγR induit le recrutement de la PTK Syk (voir figure C, étape 2). Ce recrutement est essentiel, puisque les cellules n'exprimant pas cette PTK ne peuvent ingérer avec la même efficacité les particules opsonisées [89, 101]. Afin que ce recrutement ait lieu, l'ITAM du FcγR doit être phosphorylé sur les deux résidus tyrosines pour que Syk puisse s'y lier via ses deux domaines SH2 [98]. Même si la phosphorylation de l'ITAM est probablement catalysée par les PTK de la famille Src, certains ont suggéré que Syk pourrait y participer. En effet, chez les macrophages déficients pour les PTK de la famille Src on remarque une activation de Syk moins forte que chez les macrophages normaux à la suite du pontage des FcγR [101]. Dans ce modèle, un nombre réduit de molécules Syk serait associé en permanence aux ITAMs chez les cellules au repos. Suite à l'engagement des récepteurs et à leur agrégation, ces molécules associées serviraient à phosphoryler les ITAMs des récepteurs adjacents, causant un recrutement additionnel de Syk [98].

Une fois liée à l'ITAM, la PTK Syk peut s'autophosphoryler et être phosphorylée et activée par les PTK de la famille Src pour ensuite phosphoryler d'autres protéines de la cascade intracellulaire (voir figure C, étape 3). Les cascades de signalisation déclenchées par Syk à la suite du pontage des FcγR activateurs mèneront finalement à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, à l'activation des PKC ainsi qu'à la transcription de gènes au noyau [79]. Le bon déroulement du processus phagocytaire requiert effectivement l'activation des PKC [102-105]. Entre autres, lors de la phagocytose via les FcγR, la surexpression d'un mutant dominant-négatif de l'isoenzyme α de la PKC inhibe sévèrement l'internalisation des particules opsonisées [106].

La PTK Syk n'est pas impliquée dans la polymérisation de l'actine lors de la phagocytose, puisque chez des souris Syk<sup>-/-</sup> il est possible de détecter la présence de coupes d'actine sous les particules liées aux FcγR [101]. De même, l'inhibition de PI 3-kinase, une kinase en aval de Syk, freine le processus phagocytaire, mais n'a pas d'effet sur la formation de coupes d'actine [107, 108]. Ainsi, bien que la PTK Syk soit requise pour l'internalisation de la particule, ce sont plutôt les PTK de la famille Src (Hck, Fgr, Fyn) qui participent à la polymérisation de l'actine [99]. La PTK Fgr, quant à elle, régule négativement la réorganisation du cytosquelette en s'associant avec le récepteur SIRPα. En effet, suite à l'activation de la cellule via les FcγR, cette PTK permet le recrutement de la phosphatase SHP-1 à la membrane [109]. Cette phosphatase est impliquée dans l'inhibition de nombreuses réponses cellulaires [110]. Le recrutement de SHP-1 est indépendant de la fonction kinase de Fgr [109].

Afin de réguler les cascades d'activation enclenchées par la PTK Syk, des signaux inhibiteurs sont nécessaires. Ceux-ci sont induits par l'activation de SHIP, une inositol phosphatase qui inhibe les cascades de signalisation enclenchées par la PI 3-kinase, entre autres lors de la phagocytose via les FcγR. Suite à la reconnaissance de particules opsonisées, les FcγR activateurs et inhibiteurs sont agrégés et la phosphatase SHIP s'associe à l'ITIM phosphorylé du récepteur FcγRIIB. SHIP hydrolyse ensuite le P(3,4,5)IP<sub>3</sub> dont la formation est catalysée par la PI 3-kinase, inhibant les cascades engendrées par cette kinase. Le mécanisme exact de la régulation négative de la phagocytose via les FcγR par SHIP demeure inconnu [111, 112].

Chez les Fc $\gamma$ R ne comprenant pas d'ITAM dans la chaîne principale du récepteur, le domaine cytoplasmique de la chaîne  $\alpha$  permet de moduler la phagocytose. La présence de ce domaine augmente effectivement la capacité et la rapidité de phagocytose, ce qui est probablement la conséquence d'une phosphorylation constitutive de celui-ci sur résidu sérine [113, 114].

### 6.3 Extension des pseudopodes

L'extension initiale des pseudopodes est un événement indépendant de la phosphorylation sur résidus tyrosine et de la polymérisation de l'actine. En effet, la présence de la chaîne  $\alpha$  de Fc $\gamma$ RI sans son domaine cytoplasmique et sans son association avec la chaîne  $\gamma$  est suffisante pour initier cette extension. Suite à cette observation, il a été suggéré que l'extension initiale de pseudopodes est induite par l'interaction séquentielle des récepteurs à la surface du phagocyte avec les ligands à la surface de la particule opsonisée, ce qui cause un soulèvement de la membrane autour de la particule [29]. Ceci est en accord avec le modèle du « zippering » proposé en 1975 [115]. Cette extension des pseudopodes ne peut par contre mener à la phagocytose de la particule sans le support éventuel du cytosquelette, ni sans le recrutement de membrane additionnelle au site d'ingestion [29].

Certes, lors de l'ingestion de particules, un renouvellement de la membrane doit se produire, via un recrutement à partir de réserves intracellulaires. La source exacte de membrane demeure pour l'instant inconnue. La PI 3-kinase, dont un ou plusieurs isoformes sont requis lors de la phagocytose via les Fc $\gamma$ R, joue un rôle dans ce recrutement en coordonnant l'insertion de membrane exocytique dans la membrane cytoplasmique. Cette

insertion permettrait ainsi une extension maximale des pseudopodes autour de la particule opsonisée [98, 107, 116]. Cette kinase, à la suite de son activation par des PTK, catalyse la formation de phosphatidylinositol phosphates (PIP), en phosphorylant les phospholipides inositols [116, 117]. L'activité des protéines possédant des domaines PH (domaines d'homologie Pleckstrine) sera régulée par ces PIP. En effet, les domaines PH se lient aux PIP et permettent aux protéines qui expriment ces domaines de transloquer à la membrane et de s'y associer [118, 119].

#### 6.4 Polymérisation de l'actine filamenteuse

L'accumulation de coupes d'actine polymérisée (F-actine) sous les particules opsonisées liées aux Fc $\gamma$ R est une étape précoce et obligatoire du processus phagocytaire [120]. Ceci est en accord avec l'observation que la cytochalasine D inhibe la phagocytose en bloquant la polymérisation de F-actine au site d'ingestion [121]. Les PTK et les petites GTPases de la famille Rho jouent des rôles majeurs dans l'initiation et la régulation de la réorganisation du cytosquelette lors de la phagocytose.

En effet, plusieurs études démontrent l'importance des petites GTPases de la famille Rho (Rho/Rac/Cdc42) lors de la polymérisation de l'actine. Ce sont des protéines qui se déplacent entre le cytoplasme et la membrane, où elles régulent la formation de fibres de stress (Rho), la formation de lamellipodes (Rac) et la formation de filopodes (Cdc42) [122].

Il a été démontré que la protéine RhoA est essentielle lors de la phagocytose via les Fc $\gamma$ R et que Rac1 ainsi que Cdc42 sont requises pour la polymérisation optimale de l'actine via ces récepteurs. Il est possible que RhoA agisse sur les événements précoces du processus

phagocytaire, alors que les protéines Rac1 et Cdc42 seraient plutôt impliquées dans les événements plus tardifs du réarrangement du cytosquelette [92, 123, 124]. Bien que la phagocytose via les FcγR nécessite la présence de Rho, Rac et Cdc42, ce n'est pas le cas pour la phagocytose via le récepteur du complément CR3. Effectivement, l'internalisation via ce récepteur implique seulement la protéine Rho [125]. Rac et Cdc42 activent les voies de signalisation des MAPK JNK et p38 [126, 127]. De plus, Rac régule le niveau d'activation de la NADPH oxydase, une enzyme impliquée dans la production d'anions superoxydes [128, 129]. Le recrutement et l'activation différentiels des GTPases de la famille Rho par FcγR et CR3 pourraient ainsi expliquer pourquoi la phagocytose via les FcγR induit une réponse inflammatoire alors que la phagocytose via les CR3 est silencieuse [125].

Rho régule l'activité de la PIP 5-kinase ainsi que les niveaux de PI(4,5)P<sub>2</sub> dans la cellule. Le PIP<sub>2</sub> participe à la régulation de l'activité de plusieurs protéines se liant à l'actine telles la profiline, l'α-actinine et la gelsoline. Par conséquent, la régulation des niveaux de PIP<sub>2</sub> par Rho implique cette protéine dans la régulation du cytosquelette [130].

La protéine Rac1 est activée par PI 3-kinase [131]. Le mécanisme d'action de Rac1 repose sur l'activation de LIM-kinase 1, une sérine kinase qui agit sur la cofiline [132, 133]. La cofiline est une protéine qui participe à la dépolymérisation des filaments d'actine [134]. Une activation de LIM-kinase 1 mène à une phosphorylation et une inhibition de la cofiline, ce qui augmente la stabilité du cytosquelette [132, 133]. Rac participe aussi au décoiffement des filaments d'actine, permettant l'élongation subséquente de ceux-ci. En effet, Rac1 empêche la gelsoline (la protéine coiffante) de se lier aux filaments d'actine [135, 136].

Rac interagit également avec ARF6. La GTPase ARF6 est requise lors de la phagocytose via les FcγR et participe au réarrangement du cytosquelette selon un mécanisme

dépendant de PIP<sub>2</sub>. Lorsque l'activité de cette protéine est inhibée, les capacités phagocytaires de la cellule sont diminuées et l'accumulation d'actine au point d'ingestion est atténuée. Le mécanisme exact par lequel ARF6 régule la phagocytose n'est pas connu pour le moment. Il a été toutefois proposé qu'ARF6 sert d'intermédiaire entre le trafic de membrane et le réarrangement du cytosquelette [95].

La protéine Cdc42 joue un rôle moins important que la protéine Rac1 dans la phagocytose. Ceci est potentiellement dû au fait que Cdc42, au lieu d'initier le décoiffement des filaments d'actine ou leur nucléation, modulerait plutôt l'architecture des pseudopodes [123]. La GTPase Cdc42 est localisée majoritairement dans l'appareil de Golgi et participe à la formation de queues d'actine servant à propulser les vésicules du Golgi vers la membrane [137, 138]. Ceci est possible grâce à l'interaction de Cdc42 avec N-WASP (« Wiskott-Aldrich Syndrome Protein »), une protéine activée par PIP<sub>2</sub> qui se lie au complexe Arp2/3 et stimule son habileté à initier la polymérisation de filaments d'actine [122].

## 6.5 Internalisation de la particule

L'internalisation de la particule implique la fermeture des pseudopodes enrichis en F-actine derrière la particule opsonisée. La particule se retrouve ainsi complètement englobée par la cellule et est contenue dans une vacuole appelée phagosome.

La protéine myosine IC participe à ce processus de fermeture en exerçant une contraction de la membrane à l'extrémité qui se referme autour de la particule. Cette contraction est semblable à la fermeture des cordons d'une bourse [139]. La protéine amphiphysine II intervient aussi dans la formation du phagosome. Elle est recrutée à la

membrane grâce à l'activité de la PI 3-kinase et y recrute à son tour la protéine dynamine II [140-142]. La GTPase dynamine II est impliquée dans le processus endocyttaire car elle participe à la séparation des endosomes recouverts de clathrine de la membrane cytoplasmique lors de leur formation [143-146]. La mutation du domaine permettant à l'amphiphysine II de se lier à la dynamine II inhibe la phagocytose à l'étape de l'extension des pseudopodes autour de la particule [141, 142].

La PTK Syk est requise pour la fermeture du phagosome [99]. Les protéines Cdc42 ou Rac1 pourraient aussi être impliquées dans cette étape, car elles participent au recrutement de PTP au site d'ingestion. Ce recrutement favoriserait l'internalisation de la particule opsonisée, puisqu'il a été démontré qu'une accumulation de protéines phosphorylées sur résidus tyrosine sous les particules liées aux FcγR inhibe l'ingestion de ces particules [124].

À la suite de l'internalisation de la particule, l'actine est dépolymérisée et le phagosome devient accessible aux endosomes pour sa maturation [30].

## 6.6 Maturation du phagosome

La maturation du phagosome est nécessaire pour la digestion adéquate de la particule ingérée. Cette maturation s'effectue par une série de fusions et fissions partielles et transitoires avec des endosomes précoces, puis tardifs et finalement avec des lysosomes [147].

Lors de ces multiples fusions, la membrane du phagosome acquiert et perd plusieurs marqueurs, tels les membres de la famille Rab et les protéines de la famille Lamp [147]. La famille Rab est constituée de petites GTPases qui régulent le transport intracellulaire des vésicules. Deux protéines de cette famille sont cruciales pour la maturation du phagosome.



La protéine Rab5, présente dans la membrane des endosomes précoces, permet les fusions entre ces endosomes ainsi que le recyclage de leurs récepteurs [122]. La protéine Rab7 est quant à elle associée aux endosomes tardifs et lysosomes [148] et est impliquée dans le contrôle du trafic vésiculaire entre ces compartiments [149]. L'acquisition et la perte de ces différentes protéines confèrent aux phagosomes dits précoces la capacité de fusionner préférentiellement avec les endosomes précoces et aux phagosomes tardifs la capacité de fusionner sélectivement avec les endosomes plus tardifs [150]. Ces événements de fusion sont aussi régulés par la phosphorylation et la déphosphorylation de certaines protéines du phagosome [151].

Lors de ces nombreux événements de fusion impliqués dans la maturation du phagosome en phagolysosome, un échange de contenu cytoplasmique se produit entre les organelles, via la formation d'un pore transitoire [150]. Ce pore permettra l'acquisition séquentielle de diverses hydrolases et autres enzymes nécessaires à la formation de pompes à protons. L'acidification du phagolysosome qui s'ensuit mène à l'activation des hydrolases qui participent à la dégradation de la particule ingérée [30].

## **ARTICLE**

**DAP12 negatively regulates FcγRI-mediated phagocytosis in RAW 264.7  
macrophages**

Angélique Longtin, Albert Descoteaux and Pascale Duplay\*

**INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada**

\*corresponding author :

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier

531 Boulevard des Prairies

Laval, QC H7V 1B7

Canada

Tel : (450) 687 5010

Fax : (450) 686 5301

e-mail : [pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca)

Key words : ITAM, IgG2a, signal transduction, mouse

Running title : DAP12-mediated inhibition of phagocytosis

## ABSTRACT

In myeloid cells, function of DAP12 and its associated receptors (MDL-1, SIRP $\beta$ -1, TREM-1, TREM-2 and TREM-3) remains speculative. Here, we have investigated the role of DAP12 in phagocytosis by generating stable transfectants of the macrophage cell line RAW 264.7 expressing a wild-type (Flag-DAP12) or a version of DAP12 containing a mutation in its ITAM (Flag-DAP12-Y76F). Our data indicate that phagocytosis of IgG2a-opsonized sheep red blood cells (IgG2a-SRBC) by Flag-DAP12-Y76F clones was significantly increased when compared with Flag-DAP12 cells. This was both the consequence of increased binding and internalization rates. Polymerization of F-actin surrounding IgG2a-SRBC occurred faster in Flag-DAP12-Y76F clones than in Flag-DAP12 clones. Since phagocytosis of IgG2b-SRBC, IgG3-SRBC, as well as latex beads was not affected by the expression of Flag-DAP12-Y76F, our results suggest that DAP12 may be selectively involved in the negative regulation of Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis, possibly in part by down-modulating F-actin cup formation.

## ABBREVIATIONS USED

Fc $\gamma$ R, Fc receptor for IgG; FITC, fluorescein isothiocyanate; GST, glutathione S-transferase; HRP, horseradish peroxidase; IgG, immunoglobulin G; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; LPS, lipopolysaccharide; MDL-1, myeloid DAP12-associating lectin-1; NK, natural killer; SH2, src homology 2; SIRP $\beta$ -1, signal regulatory protein  $\beta$ -1; SRBC, sheep red blood cells; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TREM, triggering receptor expressed on myeloid cells.

## INTRODUCTION

DAP12 is a small homodimer homologous to the FcR $\gamma$  and TCR $\zeta$  chains. It associates with a variety of receptors which possess a cytoplasmic domain devoid of docking motifs for signaling mediators and a transmembrane domain containing a positively charged amino-acid permitting non-covalent association with the negatively charged transmembrane domain of DAP12 [1]. Crosslinking of DAP12-receptor complexes leads to tyrosine phosphorylation of the ITAM contained in its cytoplasmic portion by Src family kinases and the subsequent recruitment and activation of Syk family tyrosine kinases [1-10].

In NK cells, DAP12 plays a crucial role in cell-mediated cytotoxicity by associating with several activating receptors (Ly49, KIR, CD94/NKG2C, NKp44), most of which recognize MHC class I molecules on the surface of target cells [1, 3, 4, 6, 7, 11-17]. In myeloid cells, identified DAP12-associated receptors include Myeloid DAP12-associating Lectin-1 (MDL-1) [18], Signal Regulatory Protein  $\beta$ -1 (SIRP $\beta$ -1) [8, 19] and Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells -1, -2 and -3 (TREM-1, TREM-2 and TREM-3) [10, 20-22]. So far, participation of DAP12 in pro-inflammatory cell activation, cell differentiation, cellular maturation, antigen-presentation and cytokine secretion in myeloid cells and cytotoxicity against tumors in NK cells has been demonstrated [8, 10, 18, 20-28]. These DAP12-associated functions explain, at least in part, the impaired innate immune responses observed in DAP12-deficient mice [24, 25].

Physiological roles for DAP12-associating receptors expressed in macrophages have yet to be

determined. In peritoneal DAP12<sup>-/-</sup> macrophages, LPS-induced NO and TNF- $\alpha$  production were normal. Moreover, DAP12 was not required for phagocytosis of latex beads [24]. However, the involvement of DAP12 in phagocytosis mediated through Fc $\gamma$  receptors has not been studied. This process involves a complex series of events, initiated by receptor clustering, which causes an extension of pseudopods and the activation of multiple intracellular signaling cascades, polymerization of F-actin at the site of ingestion and internalization of the particle via an actin-based mechanism [29-31]. Using clones of the mouse macrophage cell line RAW 264.7 expressing a dominant-negative mutant of DAP12, we investigated the role of this molecule in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis. Our results suggest that DAP12 may be implicated in the negative regulation of Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis, possibly by controlling F-actin cup formation.

## MATERIALS AND METHODS

*Constructs.* Wild-type DAP12 cDNA was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). A dominant-negative version of the gene (Y76F) was generated by site directed mutagenesis (primer sequence 5'-GTCAGTGTATACTTCTGGTCTCTGACCCTGAAGCTCCTGAAAAGGCGACTC -3'). Sequence of the mutant was confirmed by DNA sequencing. The Flag epitope (along with the immunoglobulin signal sequence) was added to both the wild-type DAP12 (Flag-DAP12) and the mutated version (Flag-DAP12-Y76F) by insertion into the pS497 vector (kindly provided by M. Thome, Institut de Biochimie, Epalinges, Switzerland). Both constructs were then cloned into the BSR $\alpha$ EN bi-cistronic vector (kindly provided by A. Shaw, St Louis, MO).

*Cell culture and stable transfections.* A sub-clone of the murine macrophage cell line RAW 264.7 (ATCC) was cultured in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub> in complete medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with glutamine (Life Technologies Inc., ON, Canada), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Hyclone, Logan, UT), 10 mM HEPES pH 7.3, and antibiotics). Transfections and selection of stable transfectants were performed as described [32, 33], in complete medium containing 500  $\mu$ g/ml G418 (Life Technologies Inc.). Individual clones were examined for Flag-DAP12 levels both by Western blot and flow cytometry analysis.

*Antibodies.* A polyclonal antibody specific for the cytoplasmic portion of DAP12 was generated in our laboratory by immunizing rabbits with a GST-DAP12 fusion protein



containing the entire cytoplasmic domain of DAP12. The monoclonal anti-Flag M2 antibody was purchased from Sigma-Aldrich Inc. (Saint Louis, MO). The rabbit anti-Syk antibody was a kind gift from A. Veillette (Institut de Recherche Clinique de Montréal, Montréal, Canada) and the anti-phosphotyrosine antibody (4G10) was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Hybridomas producing anti-SRBC antibodies TIB109 (IgG2b), TIB111 (IgG2a) and TIB114 (IgG3) and hybridoma HB-197 producing the rat anti-Fc $\gamma$ RII/Fc $\gamma$ RIII antibody (2.4G2) were all purchased from ATCC.

*Immunoprecipitations and Western blot analysis.* Adherent macrophages ( $8 \times 10^6$ ) were grown overnight in 100 mm plastic tissue culture dishes. When indicated, cells were either stimulated or cell surface biotinylated prior to lysis. Cells were subsequently washed on ice with cold phosphate-buffered saline (PBS), then with cold PBS containing 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and homogenized in 500 $\mu$ l lysis buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Nonidet P-40 containing protease (Protease Inhibitor Cocktail, Boehringer Mannheim) and phosphatase (50 mM NaF, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1.5 mM EGTA) inhibitors]. Proteins were immunoprecipitated from total cell lysates using 2  $\mu$ g of the appropriate antibody coated onto immobilized recombinant Protein A beads (Intermedico, ON, Canada). When required, samples were reduced by adding 0,1M D.T.T. (dithiothreitol) (Fischer Scientific, Nepean, ON) to sample buffer. Samples were transferred, using a semidry blotting apparatus, onto Hybond-ECL membranes (Amersham Life Science Inc., ON, Canada) and immunoblotted with anti-phosphotyrosine, anti-DAP12 or anti-Syk antibodies diluted in TBS containing 0.1% Tween-20 and 5% BSA (ICN Biomedicals Inc.). Membranes were probed with Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse antiserum (Jackson ImmunoResearch Laboratories

Inc., West Grove, PA), HRP-conjugated anti-rabbit antiserum or HRP-conjugated-streptavidin (both from Amersham Life Science, ON, Canada). Protein detection was achieved by chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science).

*Flow cytometry.* Macrophages were harvested, centrifuged and incubated with the primary antibody in 150  $\mu$ l PBS-1% FCS-0.5% azide for 1 h at 4°C. Cells were washed twice in PBS-FCS-azide to remove excess antibodies, and the FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> secondary antibody (ICN-Cappel, Aurora, OH) was added (in 150  $\mu$ l PBS-FCS-azide) for 30 min at 4°C. Cells were again washed twice, resuspended in 500  $\mu$ l PBS-FCS-azide and analyzed by flow cytometry (Coulter XL, Coulter Electronics, Hialeah FL).

*Biotinylation of surface proteins.* Adherent macrophages ( $8 \times 10^6$  cells grown overnight in 100 mm plastic tissue culture dishes) were washed twice with PBS. The biotinylation solution containing 0.2 mg/ml EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL) diluted in PBS pH 8, 3 M NaCl was added for 30 min at room temperature. Cells were washed quickly, then placed for 5 min on ice in PBS pH 8, 3 M NaCl containing 20 mM glycine to block the biotinylation reaction. Cells were washed twice in PBS, twice in PBS containing 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and homogenized as described above.

*RNA extraction, RT-PCR and PCR analyses.* RNA was prepared from adherent quiescent RAW 264.7 macrophages ( $8 \times 10^6$  adherent cells grown overnight in 100 mm plastic tissue culture dishes) as previously described [34]. cDNA was generated by RT-PCR with 5  $\mu$ g of total RNA, 400 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV Reverse

Transcriptase) (Life Technologies Inc.) and oligo(dT) primers. PCR amplification was achieved on the cDNA equivalent of 500 ng of RNA, using 200  $\mu$ M of each dNTP, 200 nM of each of the stated primers and 2.5 U *Taq* polymerase. Amplification of MDL-1 was done with sense primer AD-126 (5'-CGAAAGTACCATGCCTACAAGGAG-3') and antisense primer AD-127 (5'-CGATAGCTGACTTCACATGATGCAG-3'). TREM-2 was amplified using sense primer AD-130 (5'-ACTTATGACGCCTTGAAGCACTG-3') and antisense primer AD-131 (5'-AAGTTGGTGCCAGCATCTTGG-3'). Positive RT-PCR control was done by amplifying  $\beta$ -actin (sense primer 5'-GAGGGAAATCGTGCGTGACATCAA-3' and antisense primer 5'-GGAACCGCTCGTTGCCAATAGTGA-3'). Program used : 5 min at 95°C, 39  $\times$  (1 min at 95°C, 1 min at 57°C, 1 min at 72°C), 7 min at 72°C.

*Crosslinking experiments and quantification of TNF- $\alpha$*  96-well plates were coated overnight at 4°C with 100  $\mu$ g/ml goat anti-mouse F(ab')<sub>2</sub> fragment specific for the Fc portion of Ig (ICN-Cappel, Aurora, OH) in PBS. Excess antibody was removed by two washes in cold PBS, two washes in complete DMEM, two washes in PBS. Next, anti-Flag M2 antibody (10  $\mu$ g/ml) in PBS was added for two hours at room temperature. Excess antibody was removed, macrophages were seeded in triplicate in the coated wells (10<sup>5</sup>/well) and incubated overnight at 37°C. The amount of TNF- $\alpha$  in supernatant was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, using a monoclonal hamster anti-mouse TNF- $\alpha$  antibody and a monoclonal biotin-labeled rat anti-mouse TNF- $\alpha$  antibody (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) [33].

*Opsonization of SRBC.* SRBC (ICN-Cappel) were opsonized by incubation with monoclonal

anti-SRBC antibodies (TIB109, TIB111 or TIB114) at a concentration of 10 µg/ml, in DMEM without FCS, for 1 hour at 4°C. IgG-SRBC were washed and resuspended in complete DMEM.

*Binding and phagocytosis of IgG-SRBC and latex beads.* Analysis of IgG-SRBC binding and phagocytosis was performed as detailed [35] with some modifications. Adherent cells ( $8 \times 10^5$ ) were grown overnight on glass coverslips placed at the bottom of 6-well plates. When indicated, cells were stimulated for 18 h with 10 ng/ml LPS (*Escherichia coli* strain 0127:B8, Sigma, St. Louis, MO). For attachment experiments, cold IgG-SRBC (at a ratio of SRBC-to-macrophage of 20:1) were added to the cells by short (1 min) slow speed centrifugation of the plates and incubated at 4°C. Cells were vigorously washed four times in cold DMEM without FCS, coverslips were removed, fixed immediately in 100% methanol and stained with LeukoStat™ (Fischer Scientific, Nepean, ON). For phagocytosis experiments, two approaches were taken. In some cases, IgG-SRBC (at a ratio of SRBC-to-macrophage of 20:1) or 3 µm latex beads (Polysciences Inc., Warrington, PA) (at a ratio of bead to macrophage of 10:1) were added (without centrifugation) to cell cultures at 37°C for one hour. Alternatively, cold IgG-SRBC were first bound to cell surface by short, slow speed centrifugation and incubated at 4°C for 30 min, after which time unbound IgG-SRBC were washed away. Cells were then transferred at 37°C in complete DMEM for the indicated time points in order to permit ingestion of bound particles. At the end of the incubation periods, cell cultures were washed in DMEM without FCS, incubated in 0.17 M NH<sub>4</sub>Cl for 7 min at room temperature to lyse non-internalized IgG-SRBC and coverslips were removed, fixed and stained with LeukoStat™. After phagocytosis of latex beads, cell cultures were vigorously

washed four times with DMEM without FCS and coverslips removed, fixed and stained. Bound or ingested particles were enumerated by light microscopy.

*Confocal fluorescence microscopy.* Adherent cells ( $8 \times 10^5$ ) cells were grown overnight on glass coverslips placed at the bottom of 6-well plates. Binding of IgG2a-SRBC was carried out as described above. Cell cultures were washed twice in PBS and coverslips were removed and fixed in 3.7% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature. Cells were incubated in the permeabilization solution (PBS containing 1 mM  $Mg^{++}$ , 0.1 mM  $Ca^{++}$ , 0.2 % gelatin (all from Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO), 1% BSA (ICN Biomedicals Inc., Aurora OH) and 0.01% Triton X-100) supplemented with 20% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) for 30 min at room temperature, then stained with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) and Texas Red-coupled anti-mouse antibody (Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA), both diluted in permeabilization solution without goat serum, for 1 h at room temperature. Coverslips were washed once rapidly, then three times for 5 min in PBS- $Mg^{++}$ - $Ca^{++}$ -BSA and mounted in ProLong<sup>™</sup> Antifade medium (Molecular Probes). Cells were examined with a Bio-Rad Radiance 2000 laser scanning confocal system mounted on a Nikon Eclipse E800 microscope, using a 100X Plan APO 1.4 NA objective. Images were analyzed using both the LaserSharp software (Bio-Rad) and Photoshop (Adobe).

## RESULTS

*Generation of stable wild-type and mutated Flag-DAP12-expressing RAW 264.7 macrophages.* To study the role of DAP12 in macrophages, we generated stable transfectants of RAW 264.7 macrophages expressing either a wild-type or mutated version of epitope-tagged DAP12 (Flag-DAP12 or Flag-DAP12-Y76F). The mutated version contains a nonfunctional ITAM. Total cell lysates from G418-resistant clones were analyzed for the presence of wild-type or mutated Flag-DAP12 proteins by Western blotting with anti-DAP12 Abs (data not shown). Three Flag-DAP12 clones and three Flag-DAP12-Y76F clones expressing high levels of Flag-DAP12 protein were selected and further characterized. Immunoprecipitation of the epitope-tagged proteins showed that these selected clones expressed comparable levels of Flag-DAP12 or Flag-DAP12-Y76F proteins (Fig. 1A). These results were confirmed by labeling cell surface proteins with anti-Flag mAbs (Fig. 1B).

*Effect of Y76F on DAP12 signaling.* It was previously reported that crosslinking of either DAP12 or DAP12-associated receptors leads to TNF- $\alpha$  secretion [10, 26, 36-38]. This is mediated by the recruitment of Syk kinase upon phosphorylation of both tyrosine residues present within the DAP12 ITAM motif. Integrity of the ITAM is generally thought to be mandatory for the signaling function of ITAM-bearing molecules [39, 40]. Mutation of the second tyrosine residue of the ITAM for a phenylalanine in the Flag-DAP12-Y76F construct should be sufficient to abolish complex formation between DAP12 and Syk kinase, therefore preventing further signaling [2, 8, 28, 39]. The signaling ability of Flag-DAP12 and Flag-DAP12-Y76F proteins was thus verified by crosslinking DAP12 with anti-Flag mAbs. Cell

supernatants were tested for the presence of secreted TNF- $\alpha$  (Fig. 2). As expected, crosslinking of Flag-DAP12 but not Flag-DAP12-Y76F led to significant levels of TNF- $\alpha$  secretion.

*DAP12-associated proteins expressed in RAW 264.7 macrophages.* To identify DAP12-associated receptors in RAW 264.7 macrophages, DAP12 complexes were immunoprecipitated with anti-Flag Abs following biotinylation of cell-surface proteins (Fig. 3A). In reduced samples, four specifically associated proteins (of high MW, 117, 20, and 16 kDa) were observed. TREM-3 has been reported to be expressed in RAW 264.7 macrophages, whereas TREM-1 is not [22]. RT-PCR analysis of RNA extracts prepared from quiescent RAW 264.7 macrophages reveals that MDL-1 and TREM-2 (most probably TREM-2b [20]) are expressed in this cell line (Fig. 3B). Therefore, the four DAP12-associated proteins observed might correspond to MDL-1, TREM-2, TREM-3 or yet unidentified proteins. Specific immunoprecipitation of these molecules will have to be performed in order to determine their identity.

*Role of DAP12 in phagocytosis via Fc $\gamma$  receptors.* Phagocytosis of latex beads is not affected by loss of DAP12-mediated signaling [24]. However, the role of DAP12 in Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis has not been studied in DAP12-deficient mice. To determine if DAP12 participates in this phagocytic process, we compared the ability of Flag-DAP12-Y76F clones, Flag-DAP12 clones and control cells to ingest IgG-opsonized particles.

Results obtained revealed that overexpression of Flag-DAP12-Y76F significantly increased phagocytosis of IgG2a-opsonized SRBC (Fig. 4A) but not IgG2b-SRBC (Fig. 4B)

or IgG3-SRBC (Fig. 4C). To improve internalization of IgG2b-SRBC and IgG3-SRBC, we stimulated macrophages overnight with LPS prior to phagocytosis in order to upregulate surface expression of the appropriate FcγR. Although the total number of IgG2a-SRBC internalized by LPS-stimulated macrophages increased, the relative difference between control cells, Flag-DAP12 clones and Flag-DAP12-Y76F clones remained the same as with unstimulated cells (data not shown). Moreover, we have observed that ingestion of latex beads was similar for all clones studied, which confirms that DAP12 is not involved in phagocytosis of latex beads [24], a process which does not occur through Fcγ receptors (data not shown).

*Role of DAP12 in the ingestion of IgG2a-opsonized SRBC.* In order to better understand the role played by DAP12 in the phagocytosis of IgG2a-opsonized SRBC, we first dissected this process into two distinct steps: the initial attachment and the subsequent internalization of the particles.

Cells expressing Flag-DAP12-Y76F bound IgG2a-opsonized SRBC at a significantly higher rate than cells expressing Flag-DAP12 (Fig. 5 A). After 5 min of attachment, almost all binding sites on the surface of Flag-DAP12-Y76F clones had been saturated, whereas it took wild type cells 30 min to reach the same level of saturation. This increased recognition of IgG2a-SRBC by Flag-DAP12-Y76F-expressing clones was not the consequence of an increased recognition by these cells of the SRBC themselves, since this increase in binding was not observed when the same experiment was performed with unopsonized SRBC (data not shown).

After 30 min of attachment at 4°C, there was no significant difference in the binding



of IgG2a-SRBC between clones. We therefore used this time point to study the internalization of the bound particles. After 30 min of binding and appropriate washing of excess IgG2a-SRBC, the cells were transferred to 37°C for either 10, 30 or 60 min. Uningested SRBC were then lysed and internalized IgG2a-SRBC were enumerated (Fig. 5B). Not only did Flag-DAP12-Y76F-expressing clones bind IgG2a-SRBC more efficiently, but they also internalized these particles at a significantly higher rate than both untransfected and Flag-DAP12-expressing cells.

*Cell surface expression of FcγR.* To ascertain that increased binding and ingestion of IgG2a-SRBC by Flag-DAP12-Y76F-expressing clones was not the consequence of an increased cell surface expression of FcγR, we analyzed the Flag-DAP12, Flag-DAP12-Y76F and wild-type cells by flow cytometry (Fig. 6). We observed no significant differences in surface expression of FcγRI, FcγRII or FcγRIII, indicating that overexpression of Flag-DAP12 and Flag-DAP12-Y76F did not affect FcγR surface expression.

*Analysis of F-actin assembly following IgG2a-SRBC binding.* Attachment of particles by Fcγ receptors leads to actin-independent, kinase-independent pseudopod extension [29] followed by F-actin polymerization which is essential for further internalization [41]. In order to further elucidate the mechanism by which Flag-DAP12-Y76F affects FcγRI-mediated phagocytosis, we first examined the rate of formation of F-actin cups under bound IgG2a-SRBC. After either 5 min of binding (at which time we had observed the greatest difference in binding between Flag-DAP12-Y76F clones and control cells) or 30 min of binding (at which time all cells studied had bound roughly the same amount of IgG2a-SRBC), excess

IgG2a-SRBC were washed away and cells were fixed, stained and observed under a confocal microscope (Fig. 7). F-actin cup formation under IgG2a-SRBC occurred at a significantly higher rate in cells expressing Flag-DAP12-Y76F than in control cells. Indeed, no F-actin cups were detected in wild-type cells incubated for 5 min with IgG2a-SRBC. After 30 min of binding however, F-actin cups under the attached particles were present to a similar extent in both Flag-DAP12-Y76F clones and wild-type cells. This suggests that DAP12 might be implicated in the regulation of F-actin cup formation following Fc $\gamma$ RI engagement.

*Syk activation during IgG2a-SRBC phagocytosis.* Syk kinase is involved in actin assembly mediated via Fc $\gamma$ R ITAMs [42]. We therefore examined the level of activation of Syk in wild-type, Flag-DAP12 and Flag-DAP12-Y76F cells following 5, 10, 30 and 60 min of IgG2a-SRBC phagocytosis at 37°C (Fig. 8). No significant differences in the kinetics or levels of Syk kinase phosphorylation were observed.

*Conformational change of DAP12 during Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis.* To document the involvement of DAP12 in Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis, immunoprecipitation of DAP12 was performed on wild type cells following phagocytosis of IgG2a-SRBC (Fig. 9). Under reducing conditions, SDS-stable DAP12 dimers appeared after 10 min of phagocytosis and further increased in presence after 30 min of ingestion. These SDS-stable dimers were not observed when cells were stimulated with unopsonized SRBC, suggesting that DAP12 is implicated in Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis.

## DISCUSSION

Recent studies have linked DAP12 to numerous functions performed by myeloid cells during the inflammatory process. In this study, we have examined the role of DAP12 in phagocytosis. To this end, we used clones of the mouse macrophage cell line RAW 264.7 expressing a dominant-negative mutant of DAP12 (Flag-DAP12-Y76F). The major finding of our study is that phagocytosis of IgG2a-opsonized SRBC is upregulated in cells expressing Flag-DAP12-Y76F. Upregulation of phagocytosis is specific to ingestion via the high-affinity Fc $\gamma$ RI receptor [43, 44], since phagocytosis of either IgG2b-SRBC, IgG3-SRBC or latex beads was not affected by Flag-DAP12-Y76F. These results are in agreement with the observation of Bakker *et al.* [24] that loss of DAP12 did not affect phagocytosis of uncoated latex beads by DAP12<sup>-/-</sup> macrophages, a process independent of Fc $\gamma$  receptors.

One of the earliest events following Fc $\gamma$ RI ligand binding is receptor clustering and phosphorylation of the ITAM. Signaling cascades initiated by this event lead to a reorganization of the actin cytoskeleton and the ingestion of the particle (reviewed in [30, 31]). Both the initial binding and the subsequent ingestion of the IgG2a-opsonized particles were affected by expression of Flag-DAP12-Y76F. The observed effect is likely partly the consequence of a downregulation by DAP12 of actin cup assembly. Because of the important structural similarities between DAP12 and the  $\gamma$  chain of Fc $\gamma$  receptors, a competition between both molecules for the association with Fc $\gamma$ R may explain the effect of Flag-DAP12-Y76F on Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis. Association of DAP12 with Fc $\gamma$ R has not been demonstrated. However, this competition is most unlikely since an inhibition of signaling through Flag-DAP12-Y76F in that model should lead to inhibition of phagocytosis via Fc $\gamma$ RI whereas the

opposite effect is observed in our Flag-DAP12-Y76F transfectants.

Therefore, our results suggest a possible inhibitory role associated with ITAM-bearing DAP12. Here, we propose a mechanism by which differential phosphorylation of both tyrosine residues of the DAP12 ITAM sequence can result in opposite functional effect. This model is based on previous observations suggesting that ITAMs may, in certain conditions, initiate an inhibitory signal (reviewed in [40]). For example, depending on specific pattern of  $\zeta$  chain phosphorylation, monophosphorylated ITAMs can inhibit TCR signaling [45]. It is conceivable that in macrophages, an inhibitory molecule could be associated with the unphosphorylated tyrosine residue Y65 of the ITAM of DAP12. In support of this idea, it has been reported that a phosphorylated protein of 50 to 60 kDa repeatedly coprecipitated with mutated (Y76F) DAP12 and not with wild type DAP12 [2]. If there is a low level of constitutive phosphorylation of this first tyrosine residue, an SH2-mediated interaction at this site might occur. It should be noted that the sequence surrounding Y65 (SPYQEL) closely corresponds to an ITIM consensus sequence. It is therefore possible that this inhibitory protein could be an ITIM-binding protein such as the inhibitory phosphatases SHP-1 or SHIP. Upon FcR aggregation, Src-family PTK become activated and phosphorylate tyrosine residues present in the ITAM. This leads to the binding of tandem SH2 domains of Syk to the newly phosphorylated ITAM (reviewed in [30, 31]). This high affinity binding of Syk would be sufficient to displace the inhibitor, which would then be available to inhibit surrounding effector molecules involved in Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis, resulting in feedback inhibition of phagocytosis. Because our Flag-DAP12-Y76F transfectants lack the second tyrosine of the DAP12 ITAM, displacement of this inhibitor from DAP12 is prevented, feedback inhibition of phagocytosis does not occur and attachment and internalization of IgG2a-SRBC is more

rapid. Candidates involved in DAP12-mediated inhibition include the tyrosine kinase Fgr, a negative regulator of Fc $\gamma$ R-induced phagocytosis in macrophages [46] and  $\beta$ 2-integrin receptor signaling in monocytes [47]. Fgr-mediated inhibition occurs through its binding to SIRP $\alpha$  which potentiates the association of SIRP $\alpha$  with SHP-1 and/or with Syk Y342 via its SH2 domain. The Syk/Fgr association has been proposed to prevent binding of downstream effectors, such as Vav, involved in actin remodeling and cytoskeletal rearrangement [46, 47]. Fgr/Syk association might therefore account for the DAP12-mediated inhibition of actin cup formation. However, since Syk phosphorylation during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis was similar in the Flag-DAP12 and Flag-DAP12-Y76F transfectants, Fgr-mediated inhibition of Syk kinase activity is unlikely to be responsible for the increased phagocytosis observed in our experimental model.

The model we propose implies that the DAP12/receptor complex involved in the regulation of the phagocytic process is brought into proximity of Fc $\gamma$ RI during phagocytosis. The selective effect of DAP12 on Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis therefore implies a specific relation of DAP12 with Fc $\gamma$ RI and not with Fc $\gamma$ RII or Fc $\gamma$ RIII. However, we were not able to detect an association between DAP12 and Fc $\gamma$ RI by immunoprecipitation nor by immunofluorescence. This event might be transient and therefore difficult to detect. However, the conformational change of DAP12 during Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis, which is visualized by the formation of SDS-stable DAP12 dimers in the absence of the interchain disulfide bond, demonstrates the implication of DAP12 in this event. The presence of a glycoporyin A dimerization-like motif (GlxGDxxL) in the transmembrane domain of DAP12 [48, 49] is most probably responsible for the observed effect.

Another possible explanation for the DAP12-mediated negative regulation of Fc $\gamma$ RI-

induced phagocytosis is the sequestration by DAP12 of activating effector molecules present in limiting amount. For example, the inhibitory effect mediated by DAP12 on IgG2a-SRBC ingestion might simply be the result of a competition between DAP12 and Fc $\gamma$ RI receptor complexes for the association with Syk kinase. It may be possible that if the number of ITAM/Syk complexes are limited, expression of a DAP12 protein which cannot recruit Syk may rise the pool of free Syk available for Fc $\gamma$ RI ITAM-binding, resulting in greater total Fc $\gamma$ RI phagocytic capabilities. Alternatively, interaction of endogenous DAP12 with specific Src family kinases during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis could result in significant delays in actin cup formation, suggesting the possibility that DAP12 may exert an effect on Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis independent from Syk kinase phosphorylation.

Key players in actin polymerization during Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis include small GTP-binding proteins of the Rho family (Rho/Rac/Cdc42) (reviewed in [50]). RhoA is essential for Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis and both Rac1 and Cdc42 are required for optimal actin assembly during this process [51-53]. DAP12 could have an impact on the regulation of specific regulators for Rho family proteins. Better knowledge of the numerous G-protein regulation pathways will help shed some light on this possibility.

It is obvious that modulation of actin assembly is not the only effect mediated by DAP12 during Fc $\gamma$ RI-mediated phagocytosis, since inhibition of actin polymerization by cytochalasin D prevents phagocytosis but not particle binding [29, 54]. Potential areas of action of DAP12 that will need to be investigated include ligand affinity and/or stabilization and participation in receptor clustering during phagocytosis. Indeed, it has been shown that affinity of Fc $\gamma$ RI for its ligand is fivefold greater if the Fc $\gamma$ RI  $\alpha$ -chain is cotransfected with its  $\gamma$  chain [55]. Because intracytoplasmic events appear to confer different structures and

affinities to extracellular ligand-binding domains, it may be that DAP12 can influence binding of IgG2a-opsonized particles by unknown intracellular mechanisms. Furthermore, DAP12 may act upon effectors downstream of Syk kinase such as PI3-kinase, which is required for maximal pseudopod extension during FcγR-mediated phagocytosis [56, 57]. Even if the effect of DAP12 on pseudopod extension, an actin-independent process [29, 57] is most probably not responsible for the observed cytoskeletal rearrangement in our transfectants, it will nevertheless have to be studied in order to understand the full implication of DAP12 in FcγRI-mediated phagocytosis.

Since DAP12 associates with many different receptors and since many of these receptors, along with other yet unidentified surface proteins, are expressed simultaneously in myeloid cells, it is impossible at this time to speculate on which DAP12-associated receptor(s) could be responsible for the observed effect on FcγRI-mediated phagocytosis. Furthermore, although they have yet to be identified, presence of inhibitory counterparts to the DAP12-associated receptors expressed in mouse myeloid cells cannot be excluded, raising many possibilities regarding the regulation of phagocytic functions. Future identification and characterization of DAP12-associated receptors involved in FcγRI-mediated phagocytosis may contribute to our understanding of the molecular mechanisms involved in this process.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marcel Desrosiers for assistance during confocal microscopy experiments. We also thank M. Thome for providing the pS497 vector and A. Shaw for his gift of the BSR $\alpha$ EN vector. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to A.D. and P.D. A.L. was partly supported by a studentship from the Fondation Armand-Frappier. A.D. is a Scholar from the Fonds de la recherche en santé du Québec and holder of a Canada Research Chair. P.D. is a CIHR New Investigator.



## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1 :** *Western blot and flow cytometry analysis of transfected cells.*

(A) Total cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag M2 antibodies and immunoblotted with anti-DAP12 antibodies. Flag-DAP12-Y76F migrates slightly lower than the non-mutated form.

(B) Cells were labeled with anti-Flag M2 antibodies along with FITC-conjugated goat F(ab')<sub>2</sub> fragment to mouse IgG, and analyzed by flow cytometry. Shaded histograms correspond to wild-type RAW 264.7 cells and open histograms to the indicated Flag-DAP12 or Flag-DAP12-Y76F clones.

**Fig. 2 :** *Y76F mutation abolishes DAP12-mediated secretion of TNF- $\alpha$*

Wild-type (*open bars*), Flag-DAP12 (*shaded bars*) and Flag-DAP12-Y76F cells (*closed bars*) were grown overnight in wells previously coated either with goat F(ab')<sub>2</sub> fragments specific for the Fc portion of mouse IgG alone, or F(ab')<sub>2</sub> fragments along with anti-Flag M2 antibodies. The amount of TNF- $\alpha$  secreted in cell supernatants was determined by ELISA. This experiment was performed in triplicate and similar results were obtained in three independent experiments.

**Fig. 3 :** *RAW 264.7 expression of DAP12-associated receptors.*

(A) *Cell surface biotinylation and immunoprecipitation analyses.* Quiescent wild-type (wt) cells and Flag-DAP12 clone #2 cells were surface-biotinylated and DAP12-associated proteins were co-precipitated from cell lysates with anti-Flag M2 antibodies.

Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were probed with HRP-streptavidin. Arrows point to surface proteins specifically associated with DAP12.

(B) *RT-PCR analyses.* PCR amplification of cDNA prepared by reverse transcription of total RNA extracted from quiescent RAW 264.7 macrophages. Actin was amplified as a positive RT-PCR control.

**Fig. 4 :** *Role of DAP12 in phagocytosis.*

Wild type (*open bars*), Flag-DAP12 (*shaded bars*) and Flag-DAP12-Y76F cells (*closed bars*) were plated onto coverslips and incubated at 37°C with (A) IgG2a-SRBC, (B) IgG2b-SRBC, (C) IgG3-SRBC for 1 hour. Non-internalized IgG-SRBC were lysed at the end of the incubation period. Coverslips were fixed, stained and internalized particles were enumerated. Experiments (B) and (C) were performed on cells prestimulated overnight with LPS as described in Materials and Methods. Phagocytic index (PI) : number of particles ingested by 100 macrophages. Values represented are the mean of 5 counts (\*= p< 0.05). Data shown are representative of 6 separate experiments.

**Fig. 5 :** *Effect of Flag-DAP12-Y76F overexpression on the attachment and internalization of IgG2a-opsonized SRBC by RAW 264.7 macrophages.*

(A) *Attachment.* IgG2a-SRBC were centrifuged onto Flag-DAP12 (*closed circles*) and Flag-DAP12-Y76F (*closed squares*) clones grown on coverslips. Cells were further incubated for either 1, 5, 10 or 30 min at 4°C. Unbound IgG2a-SRBC were removed, coverslips were immediately fixed, stained and bound particles were enumerated by light microscopy.

Enumeration was performed in triplicate and each value represented is the mean value compiled for all three Flag-DAP12 clones and all three Flag-DAP12-Y76F clones studied. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

(B) *Internalization.* IgG2a-SRBC were centrifuged onto Flag-DAP12 (*closed circles*) and Flag-DAP12-Y76F (*closed squares*) clones grown on coverslips. Cells were further incubated for 30 min at 4°C. Unbound IgG2a-SRBC were removed and cells were transferred to 37°C for either 10, 30 or 60 min. Non-internalized IgG2a-SRBC were lysed, coverslips were fixed, stained and ingested particles were enumerated. Enumeration was performed in triplicate and each value represented is the mean value compiled for all three Flag-DAP12 clones and all three Flag-DAP12-Y76F clones studied. Phagocytic index (PI) : number of particles ingested by 100 macrophages. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

**Fig. 6 :** *Cell surface expression of Fcγ receptors.*

Wild-type (*top panel*), Flag-DAP12 (*middle panel*) and Flag-DAP12-Y76F (*bottom panel*) cells were labeled either with FITC-coupled F(ab')<sub>2</sub> fragment alone (*filled area*), or along with the 2.4G2 antibody (FcγRII/FcγRIII expression) (*full line*) or the TIB111 antibody (FcγRI expression) (*broken line*) and analyzed by flow cytometry.

**Fig. 7 :** *Analysis of F-actin assembly surrounding bound IgG2a-SRBC.*

IgG2a-SRBC were centrifuged onto cells adhered on coverslips and further incubated for 5 (*A and B*) or 30 (*C and D*) min at 4°C. Unbound IgG2a-SRBC were removed, coverslips were fixed and both IgG2a-SRBC (Texas Red-conjugated anti-mouse antibodies, shown in red) and

F-actin (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-phalloidin, shown in green) were stained as described in the Materials and Methods section. (A) and (C) represent wild-type cells, (B) and (D) represent Flag-DAP12-Y76F cells.

**Fig. 8 :** *Phosphorylation of Syk in IgG2a-SRBC phagocytosis.* Adherent Flag-DAP12 and Flag-DAP12-Y76F-expressing cells were incubated in the absence (t=0) or presence of IgG2a-SRBC for 5, 10, 30 and 60 min at 37°C. Syk was immunoprecipitated from cell extracts and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibodies (*top panel*). Membranes were subsequently stripped and re-blotted with anti-Syk antibodies to ensure the presence of equivalent levels of Syk kinase in the immunoprecipitates (*bottom panel*).

**Fig. 9 :** *Implication of DAP12 in FcγRI-mediated phagocytosis.* Adherent wild-type cells were incubated in the absence (t=0) or presence of SRBC opsonized (+) or not (-) with IgG2a antibodies for 10 and 30 min at 37°C. DAP12 was immunoprecipitated from cell extracts and samples obtained were split and analyzed by SDS-PAGE under reducing or non-reducing conditions. Membranes were probed with anti-DAP12 antibody.

## REFERENCES

1. Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., Phillips, J.H. (1998) Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* **391**, 703-7.
2. Tomasello, E., Olcese, L., Vely, F., Geourgeon, C., Blery, M., Moqrich, A., Gautheret, D., Djabali, M., Mattei, M.G., Vivier, E. (1998) Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12. *J Biol Chem* **273**, 34115-9.
3. Campbell, K.S., Cella, M., Carretero, M., Lopez-Botet, M., Colonna, M. (1998) Signaling through human killer cell activating receptors triggers tyrosine phosphorylation of an associated protein complex. *Eur J Immunol* **28**, 599-609.
4. Smith, K.M., Wu, J., Bakker, A.B., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (1998) Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *J Immunol* **161**, 7-10.
5. McVicar, D.W., Taylor, L.S., Gosselin, P., Willette-Brown, J., Mikhael, A.I., Geahlen, R.L., Nakamura, M.C., Linnemeyer, P., Seaman, W.E., Anderson, S.K., Ortaldo, J.R., Mason, L.H. (1998) DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **273**, 32934-42.
6. Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A. (1998) NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* **187**, 2065-72.
7. Makrigiannis, A.P., Gosselin, P., Mason, L.H., Taylor, L.S., McVicar, D.W., Ortaldo,

- J.R., Anderson, S.K. (1999) Cloning and characterization of a novel activating Ly49 closely related to Ly49A. *J Immunol* **163**, 4931-8.
8. Tomasello, E., Cant, C., Buhring, H.J., Vely, F., Andre, P., Seiffert, M., Ullrich, A., Vivier, E. (2000) Association of signal-regulatory proteins beta with KARAP/DAP-12. *Eur J Immunol* **30**, 2147-56.
  9. Mason, L.H., Willette-Brown, J., Mason, A.T., McVicar, D., Ortaldo, J.R. (2000) Interaction of Ly-49D+ NK cells with H-2Dd target cells leads to DAP-12 phosphorylation and IFN-gamma secretion. *J Immunol* **164**, 603-11.
  10. Bouchon, A., Dietrich, J., Colonna, M. (2000) Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* **164**, 4991-5.
  11. Biassoni, R., Cantoni, C., Falco, M., Verdiani, S., Bottino, C., Vitale, M., Conte, R., Poggi, A., Moretta, A., Moretta, L. (1996) The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* **183**, 645-50.
  12. Olcese, L., Cambiaggi, A., Semenzato, G., Bottino, C., Moretta, A., Vivier, E. (1997) Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunol* **158**, 5083-6.
  13. Houchins, J.P., Lanier, L.L., Niemi, E.C., Phillips, J.H., Ryan, J.C. (1997) Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* **158**, 3603-9.
  14. Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., Phillips, J.H. (1998) Association of DAP12 with

- activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* **8**, 693-701.
15. Mason, L.H., Willette-Brown, J., Anderson, S.K., Gosselin, P., Shores, E.W., Love, P.E., Ortaldo, J.R., McVicar, D.W. (1998) Characterization of an associated 16-kDa tyrosine phosphoprotein required for Ly-49D signal transduction. *J Immunol* **160**, 4148-52.
  16. Gosselin, P., Mason, L.H., Willette-Brown, J., Ortaldo, J.R., McVicar, D.W., Anderson, S.K. (1999) Induction of DAP12 phosphorylation, calcium mobilization, and cytokine secretion by Ly49H. *J Leukoc Biol* **66**, 165-71.
  17. Silver, E.T., Gong, D., Hazes, B., Kane, K.P. (2001) Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H-2D(k) and H- 2D(d). *J Immunol* **166**, 2333-41.
  18. Bakker, A.B., Baker, E., Sutherland, G.R., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (1999) Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9792-6.
  19. Dietrich, J., Cella, M., Seiffert, M., Buhring, H.J., Colonna, M. (2000) Cutting edge: signal-regulatory protein beta 1 is a DAP12-associated activating receptor expressed in myeloid cells. *J Immunol* **164**, 9-12.
  20. Daws, M.R., Lanier, L.L., Seaman, W.E., Ryan, J.C. (2001) Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *Eur J Immunol* **31**, 783-91.
  21. Bouchon, A., Hernandez-Munain, C., Cella, M., Colonna, M. (2001) A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* **194**, 1111-22.

22. Chung, D.H., Seaman, W.E., Daws, M.R. (2002) Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17. *Eur J Immunol* **32**, 59-66.
23. Aoki, N., Kimura, S., Takiyama, Y., Atsuta, Y., Abe, A., Sato, K., Katagiri, M. (2000) The role of the DAP12 signal in mouse myeloid differentiation. *J Immunol* **165**, 3790-6.
24. Bakker, A.B., Hoek, R.M., Cerwenka, A., Blom, B., Lucian, L., McNeil, T., Murray, R., Phillips, L.H., Sedgwick, J.D., Lanier, L.L. (2000) DAP12-deficient mice fail to develop autoimmunity due to impaired antigen priming. *Immunity* **13**, 345-53.
25. Tomasello, E., Desmoulins, P.O., Chemin, K., Guia, S., Cremer, H., Ortaldo, J., Love, P., Kaiserlian, D., Vivier, E. (2000) Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice. *Immunity* **13**, 355-64.
26. Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M.A., Colonna, M. (2001) TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* **410**, 1103-7.
27. Nathan, C., Ding, A. (2001) TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nat Med* **7**, 530-2.
28. Aoki, N., Kimura, S., Oikawa, K., Nochi, H., Atsuta, Y., Kobayashi, H., Sato, K., Katagiri, M. (2002) DAP12 ITAM motif regulates differentiation and apoptosis in M1 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 296-304.
29. Lowry, M.B., Duchemin, A.M., Robinson, J.M., Anderson, C.L. (1998) Functional separation of pseudopod extension and particle internalization during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med* **187**, 161-76.



30. Aderem, A., Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**, 593-623.
31. Ravetch, J.V., Bolland, S. (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **19**, 275-90.
32. Stacey, K.J., Ross, I.L., Hume, D.A. (1993) Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages. *Immunol Cell Biol* **71**, 75-85.
33. St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y., Descoteaux, A. (1998) Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* **273**, 32787-92.
34. Descoteaux, A., Matlashewski, G. (1990) Regulation of tumor necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumor necrosis factor. *J Immunol* **145**, 846-53.
35. Breton, A., Descoteaux, A. (2000) Protein kinase C-alpha participates in FcgammaR-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 472-6.
36. Perez-Villar, J.J., Melero, I., Rodriguez, A., Carretero, M., Aramburu, J., Sivori, S., Orengo, A.M., Moretta, A., Lopez-Botet, M. (1995) Functional ambivalence of the Kp43 (CD94) NK cell-associated surface antigen. *J Immunol* **154**, 5779-88.
37. Bottino, C., Sivori, S., Vitale, M., Cantoni, C., Falco, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Semenzato, G., Biassoni, R., Moretta, L., Moretta, A. (1996) A novel surface molecule homologous to the p58/p50 family of receptors is selectively expressed on a subset of human natural killer cells and induces both triggering of cell functions and proliferation. *Eur J Immunol* **26**, 1816-24.
38. Carretero, M., Llano, M., Navarro, F., Bellon, T., Lopez-Botet, M. (2000) Mitogen-activated protein kinase activity is involved in effector functions triggered by the

- CD94/NKG2-C NK receptor specific for HLA-E. *Eur J Immunol* **30**, 2842-8.
39. Chu, D.H., Morita, C.T., Weiss, A. (1998) The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev* **165**, 167-80.
  40. Love, P.E., Shores, E.W. (2000) ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity* **12**, 591-7.
  41. Greenberg, S., Chang, P., Silverstein, S.C. (1993) Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med* **177**, 529-34.
  42. Cox, D., Chang, P., Kurosaki, T., Greenberg, S. (1996) Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J Biol Chem* **271**, 16597-602.
  43. Walker, W.S. (1976) Separate Fc-receptors for immunoglobulins IgG2a and IgG2b on an established cell line of mouse macrophages. *J Immunol* **116**, 911-4.
  44. Sears, D.W., Osman, N., Tate, B., McKenzie, I.F., Hogarth, P.M. (1990) Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fc receptor for IgG. *J Immunol* **144**, 371-8.
  45. Kersh, E.N., Kersh, G.J., Allen, P.M. (1999) Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation. *J Exp Med* **190**, 1627-36.
  46. Gresham, H.D., Dale, B.M., Potter, J.W., Chang, P.W., Vines, C.M., Lowell, C.A., Lagenaur, C.F., Willman, C.L. (2000) Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr. *J Exp Med* **191**, 515-28.
  47. Vines, C.M., Potter, J.W., Xu, Y., Geahlen, R.L., Costello, P.S., Tybulewicz, V.L., Lowell, C.A., Chang, P.W., Gresham, H.D., Willman, C.L. (2001) Inhibition of beta 2

- integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr. *Immunity* **15**, 507-19.
48. Mingarro, I., Elofsson, A., von Heijne, G. (1997) Helix-helix packing in a membrane-like environment. *J Mol Biol* **272**, 633-41.
  49. Bolliger, L., Johansson, B. (1999) Identification and functional characterization of the zeta-chain dimerization motif for TCR surface expression. *J Immunol* **163**, 3867-76.
  50. Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.
  51. Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Schreiber, A., Zhang, W., Grinstein, S. (1997) Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcγ receptors in macrophages. *J Exp Med* **186**, 955-66.
  52. Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P.G., Bokoch, G.M., Greenberg, S. (1997) Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med* **186**, 1487-94.
  53. Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J.C., Chavrier, P. (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *Embo J* **17**, 6219-29.
  54. Greenberg, S., el Khoury, J., di Virgilio, F., Kaplan, E.M., Silverstein, S.C. (1991) Ca<sup>2+</sup>-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Cell Biol* **113**, 757-67.
  55. Miller, K.L., Duchemin, A.M., Anderson, C.L. (1996) A novel role for the Fc receptor gamma subunit: enhancement of Fc gamma R ligand affinity. *J Exp Med* **183**, 2227-33.
  56. Melendez, A.J., Gillooly, D.J., Harnett, M.M., Allen, J.M. (1998) Aggregation of the

human high affinity immunoglobulin G receptor (FcγRI) activates both tyrosine kinase and G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2169-74.

57. Cox, D., Tseng, C.C., Bjekic, G., Greenberg, S. (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem* **274**, 1240-7.

# FIGURES

Figure 1 :

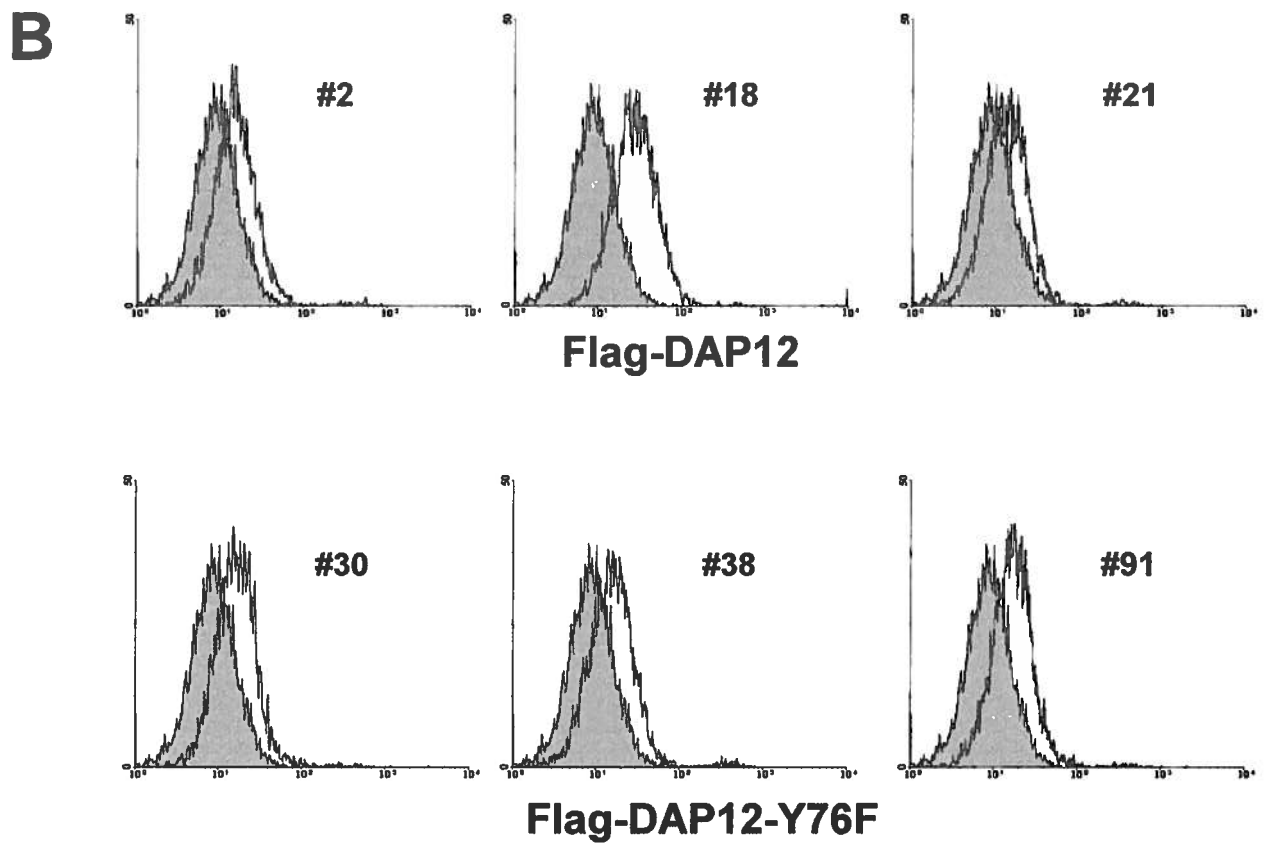
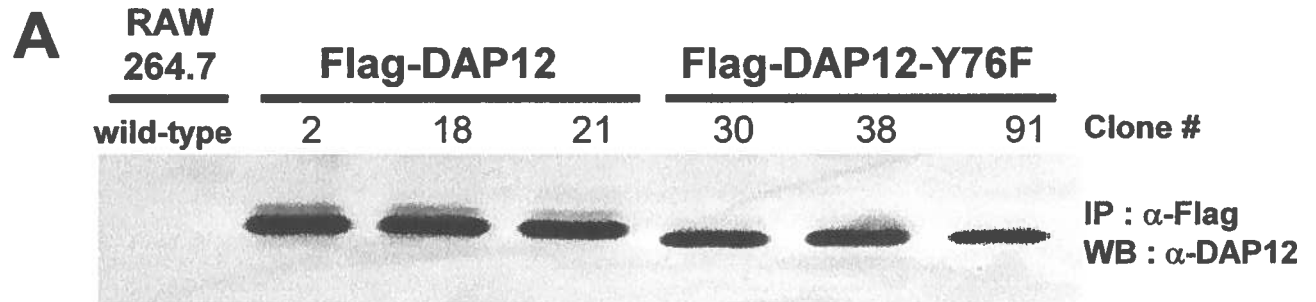


Figure 2:

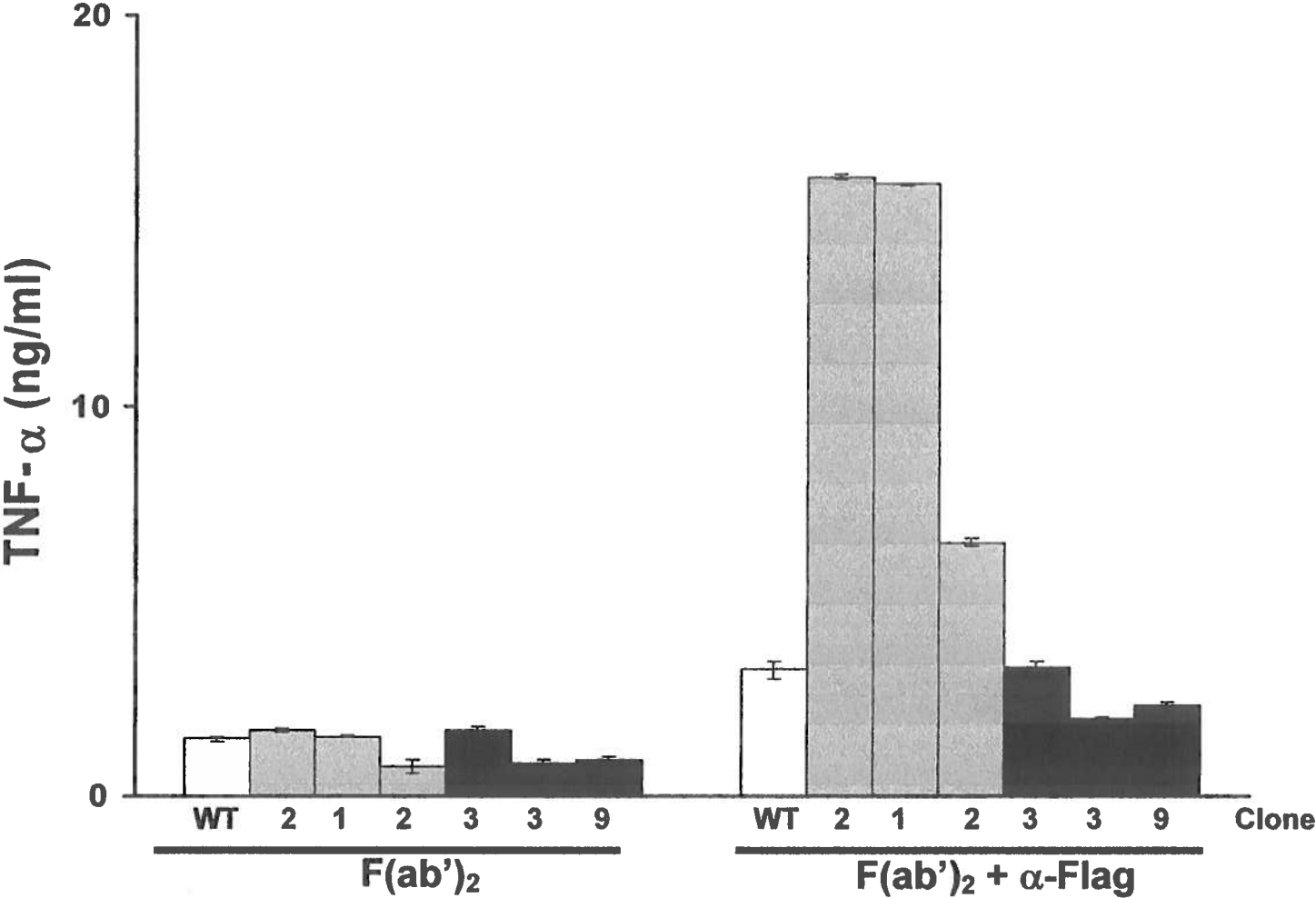


Figure 3 :

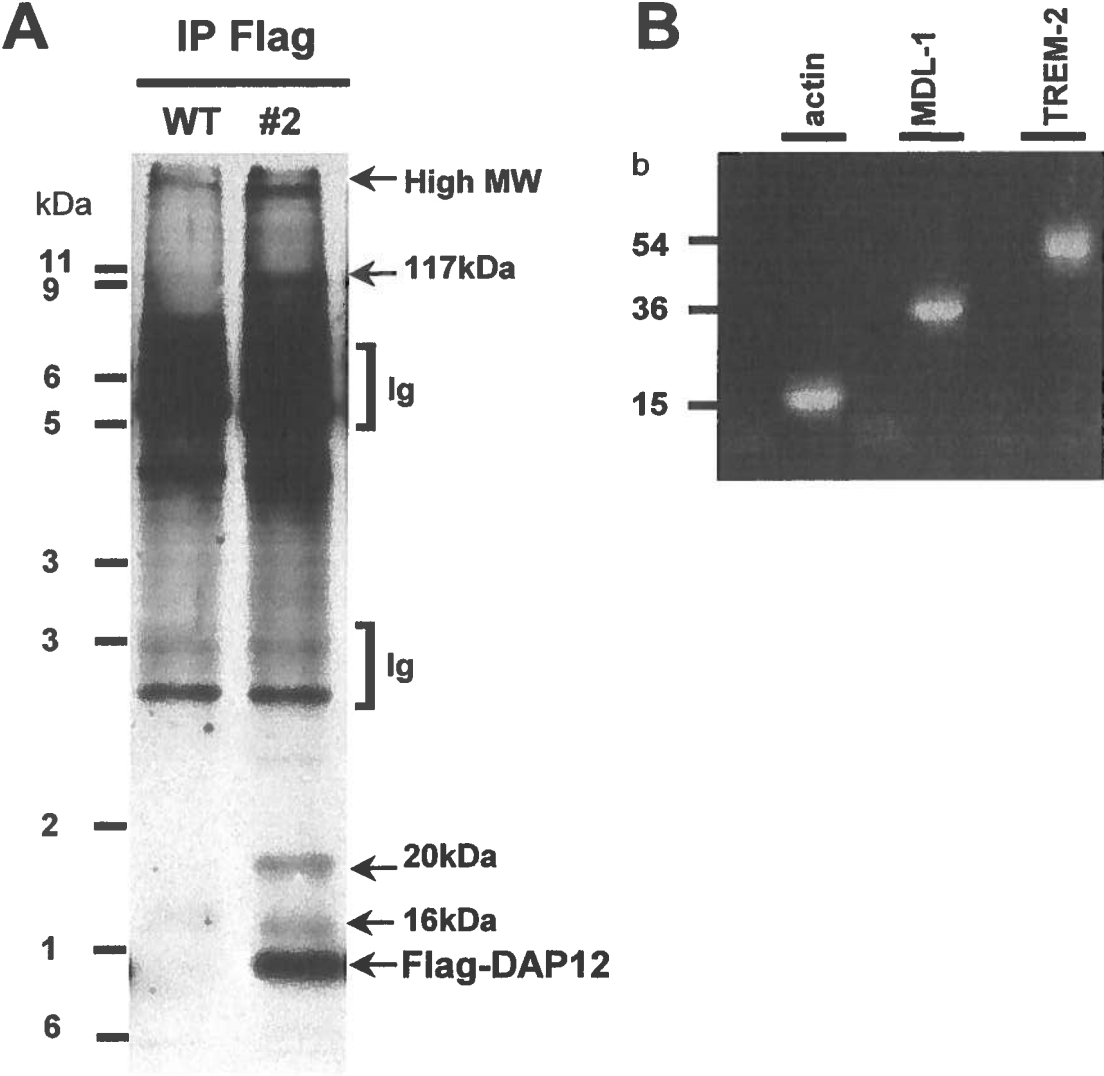


Figure 4:

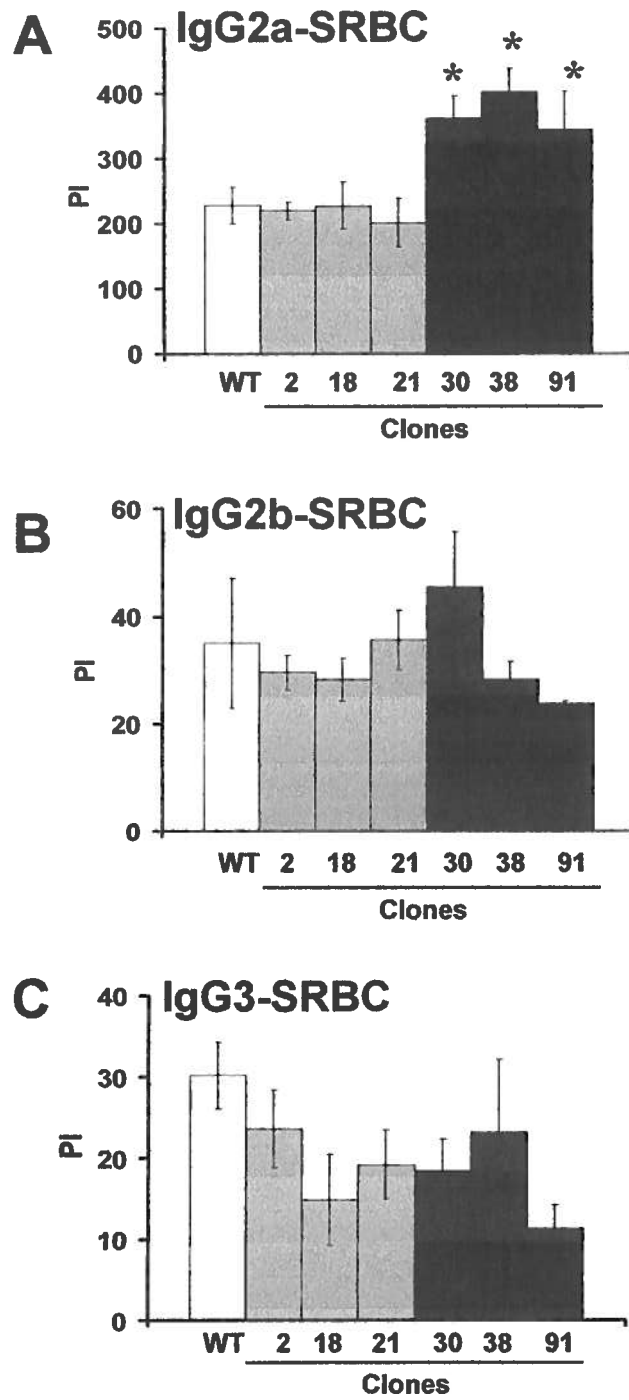




Figure 5 :

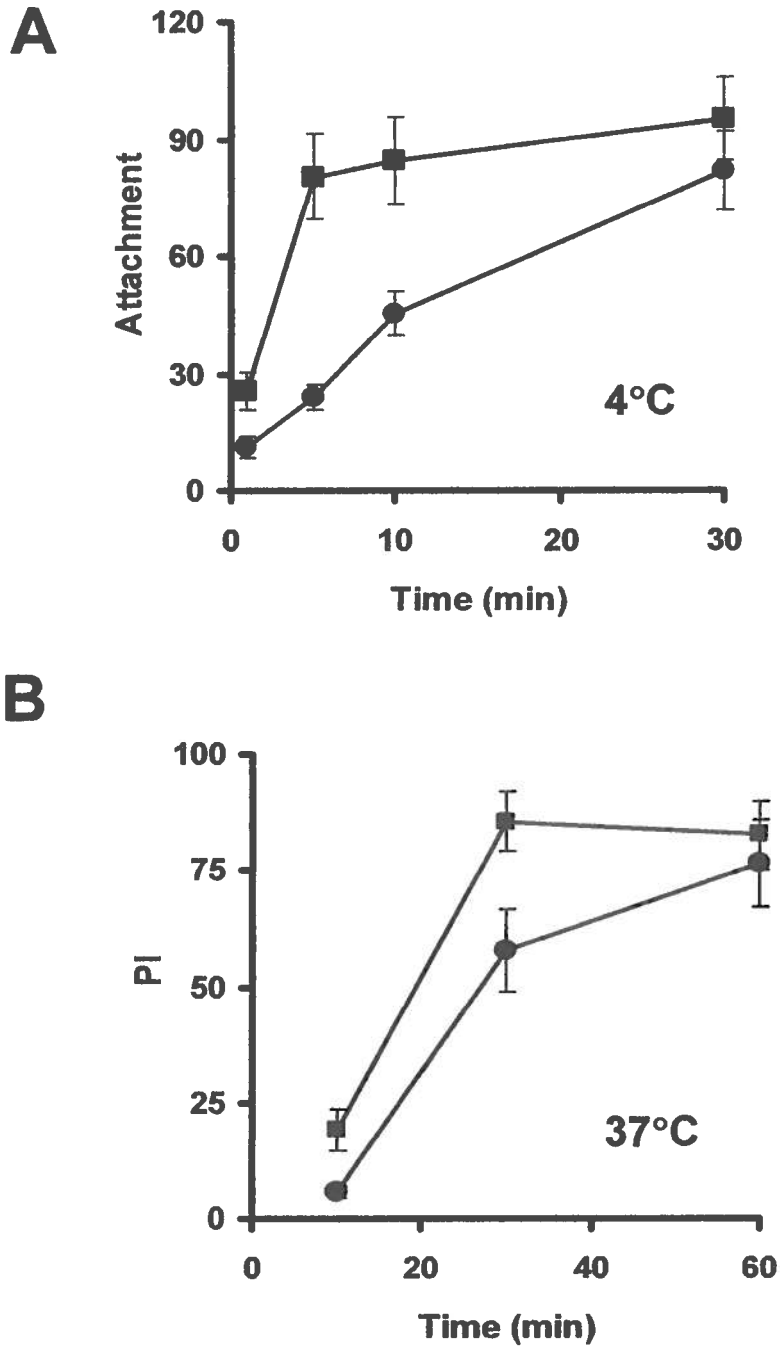


Figure 6:

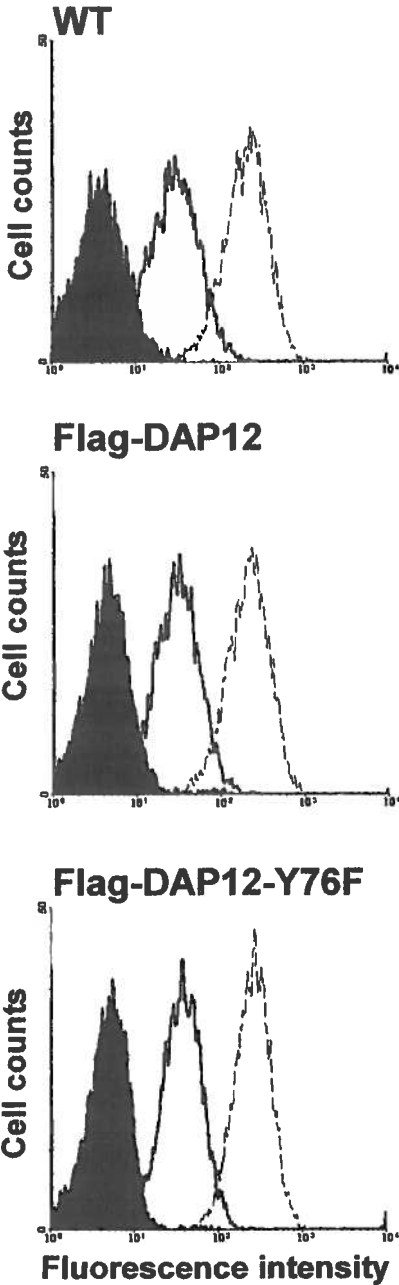


Figure 7:

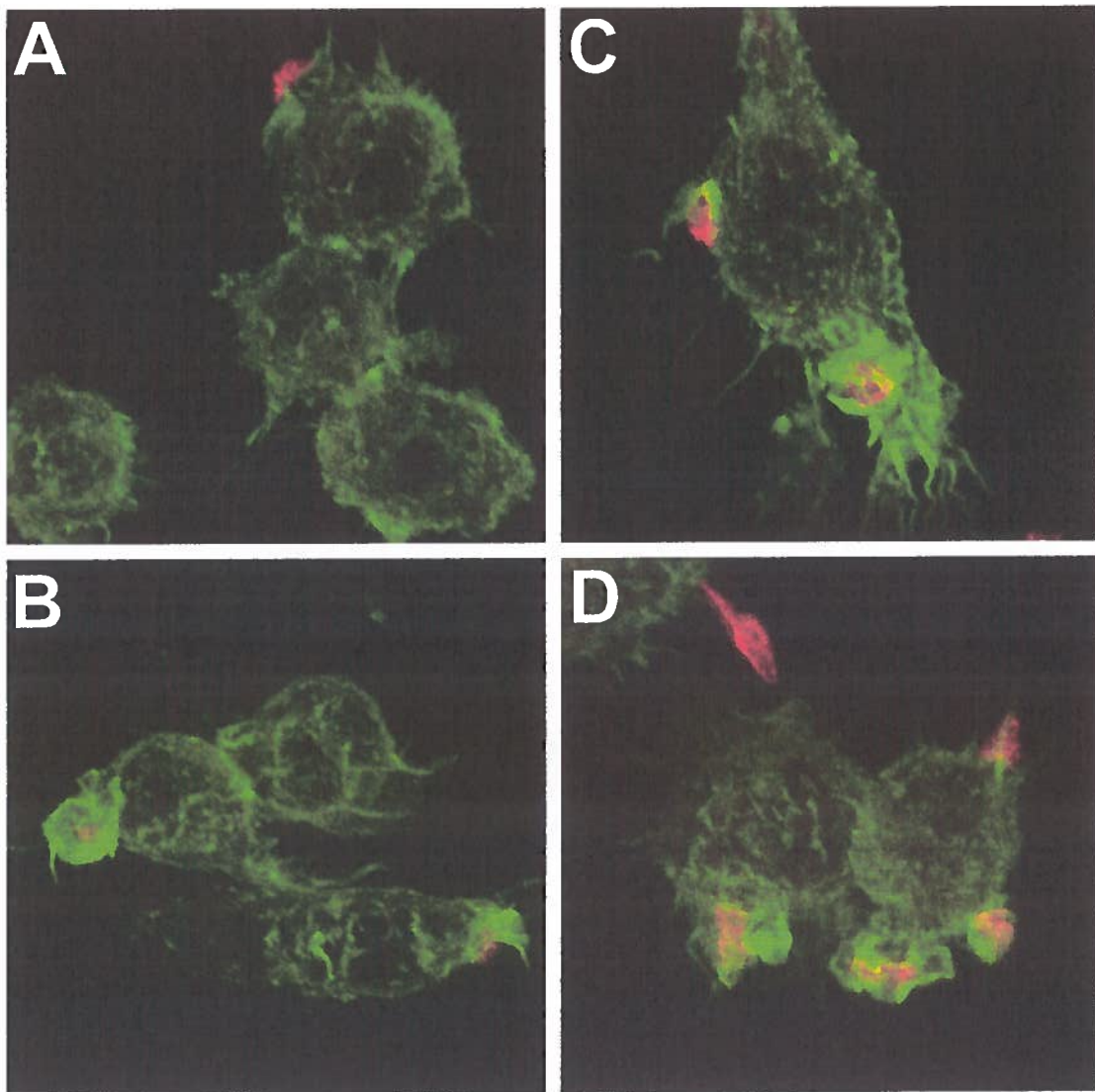


Figure 8:

**IP : Syk**

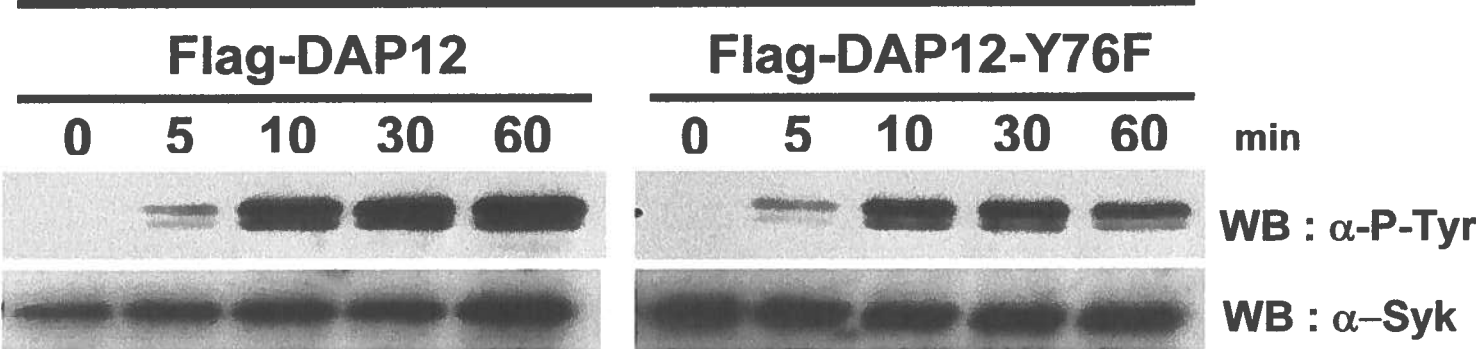
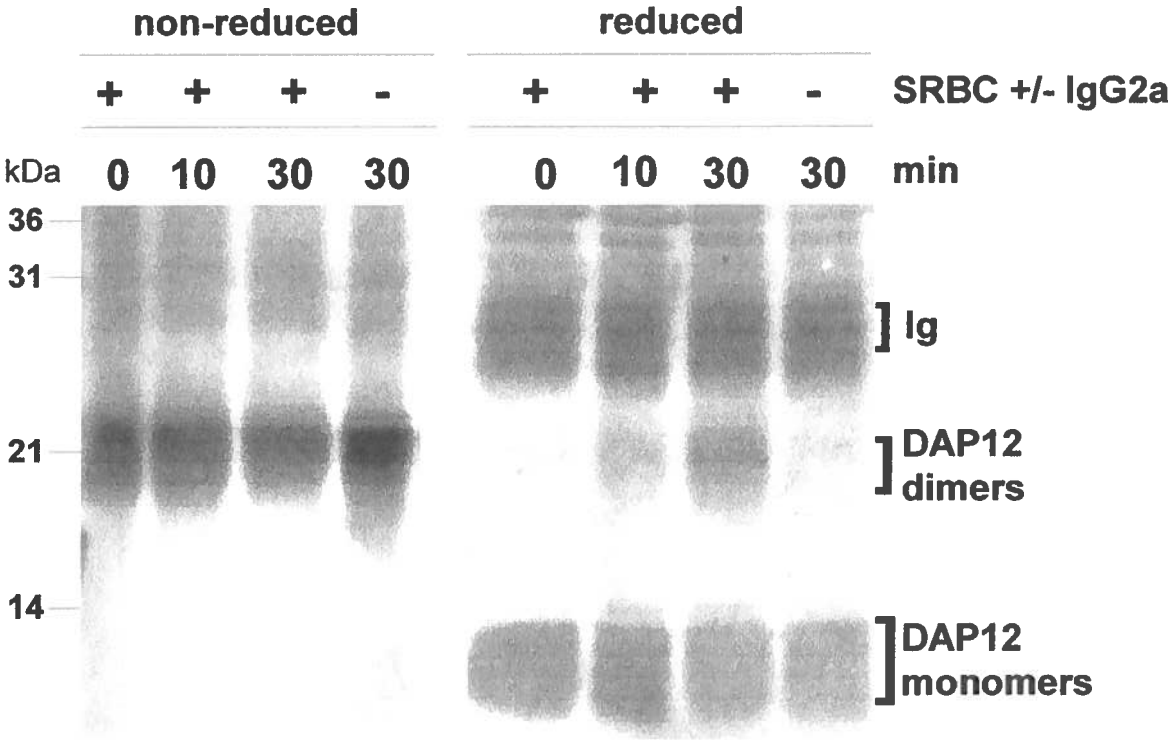


Figure 9:



IP : DAP12

WB :  $\alpha$ -DAP12

## **DISCUSSION**

Les cellules myéloïdes jouent un rôle essentiel dans le processus inflammatoire. Elles assurent la défense de l'hôte, notamment en phagocytant des parasites et des microorganismes qui l'envahissent. La régulation des différentes fonctions de ces cellules lors de l'inflammation est très complexe. La compréhension de ces mécanismes de régulation est primordiale, non seulement afin de bien comprendre toutes les étapes du processus inflammatoire, mais aussi dans le but ultérieur de développer de nouvelles approches thérapeutiques afin de traiter les différentes maladies dues à un dérèglement de ce processus. De nombreuses études récentes impliquent la protéine DAP12 dans plusieurs fonctions exercées par les cellules myéloïdes. Toutefois, le rôle de DAP12 dans la phagocytose de particules opsonisées via les récepteurs Fc $\gamma$ R, étape reliant l'immunité innée à l'immunité adaptative, n'a pas été étudié. Au cours de ce projet de maîtrise, nous avons donc choisi de déterminer l'implication de DAP12 dans cet événement critique.

L'approche expérimentale qui a été utilisée afin d'atteindre cet objectif a été de générer des clones de la lignée de macrophages murins RAW 264.7 exprimant un mutant dominant-négatif de DAP12 (Flag-DAP12-Y76F). La mutation de la protéine DAP12 que nous avons ainsi exprimée entraîne le changement du deuxième résidu tyrosine de son ITAM pour un résidu phénylalanine, rendant la protéine Flag-DAP12-Y76F incapable d'initier des cascades de signalisation. Par conséquent, les clones Flag-DAP12-Y76F ne sécrètent pas de TNF- $\alpha$  lorsque nous pontons la protéine mutée à l'aide d'un anticorps anti-Flag, comparativement au même pontage effectué sur les clones exprimant la version sauvage de Flag-DAP12. Nous avons ensuite étudié l'impact de cette mutation de DAP12 sur la phagocytose via les récepteurs Fc $\gamma$ R, en utilisant des érythrocytes de moutons opsonisés avec différents types d'IgG (IgG-SRBC).

La découverte majeure de notre étude est que la phagocytose d'érythrocytes opsonisés avec des IgG2a est augmentée chez les cellules exprimant Flag-DAP12-Y76F. Cet effet n'a toutefois pu être observé lors de la phagocytose d'IgG2b-SRBC, d'IgG3-SRBC et de billes de latex non-opsonisées. Les résultats obtenus avec les billes de latex nues concordent avec ceux du groupe du Dr Lanier, qui a démontré que chez des macrophages DAP12<sup>-/-</sup> la phagocytose de billes de latex nues est normale [24]. DAP12 semble donc influencer spécifiquement la phagocytose via les récepteurs FcγRI. En effet, les récepteurs FcγRI, initialement connus sous le nom de FcγR2a, ont été identifiés très tôt comme étant les récepteurs possédant une haute affinité pour les IgG2a [91, 159]. Les IgG2a, tout comme les IgG2b et les IgG1, peuvent cependant aussi être liées sous forme de complexes immuns par les récepteurs de faible affinité FcγRIII [165]. Toutefois, les réponses immunitaires observées chez des souris FcγRIII<sup>-/-</sup> stimulées avec des IgG2a sont normales [166]. De plus, nous n'avons pas observé d'effets spécifiques à DAP12 lors de la phagocytose d'IgG2b-SRBC, qui s'effectue principalement via les FcγRIII. Ceci suggère fortement que, dans notre modèle, DAP12 influence plus particulièrement la phagocytose via les récepteurs FcγRI. Par contre, nous ne pouvons complètement exclure une participation, aussi minime qu'elle soit, des FcγRIII en concert avec les FcγRI lors de la phagocytose d'IgG2a-SRBC. Les billes de latex non-opsonisées, quant à elles, ne sont pas liées ni internalisées via les récepteurs FcγRI.

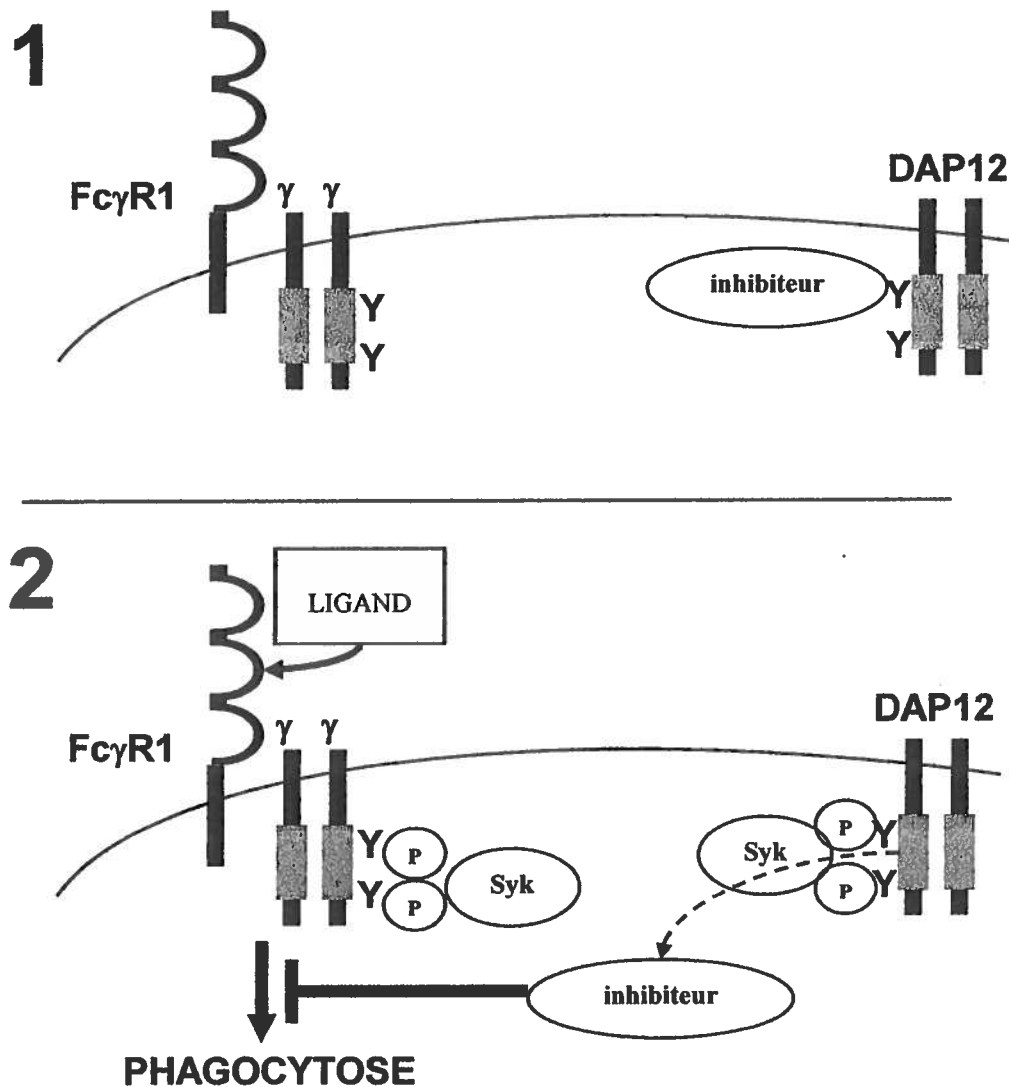
La phagocytose via les FcγRI débute avec leur agrégation à la surface, ce qui est rapidement suivi par la phosphorylation de l'ITAM contenu dans la portion cytoplasmique de ces récepteurs. Cette phosphorylation induit plusieurs cascades intracellulaires menant, entre autres, à la réorganisation du cytosquelette et à l'internalisation de la particule [29, 30]. Lors de la phagocytose d'IgG2a-SRBC, les clones exprimant la protéine Flag-DAP12-Y76F lient et



internalisent un plus grand nombre de particules opsonisées que les macrophages de type sauvage ou ceux exprimant la protéine Flag-DAP12. Cet effet est en partie la conséquence d'une régulation à la baisse par DAP12 de la formation de coupes d'actine sous la particule à ingérer. Puisque DAP12 est hautement homologue à la chaîne  $\gamma$  des récepteurs Fc [1] nous pouvons logiquement imaginer qu'un des mécanismes selon lesquels DAP12 influencerait la phagocytose via les Fc $\gamma$ RI serait par la compétition entre DAP12 et la chaîne  $\gamma$  pour l'association avec Fc $\gamma$ RI. Notons qu'une association entre DAP12 et Fc $\gamma$ RI n'a pas été démontrée à ce jour. Toutefois, nos résultats suggèrent que cette compétition est improbable. En effet, si elle avait lieu, une mutation de l'ITAM de DAP12 telle que celle présente chez nos clones Flag-DAP12-Y76F aurait pour effet d'inhiber la phagocytose via les Fc $\gamma$ RI alors que nous observons l'effet inverse dans notre modèle expérimental.

Nous proposons ici un modèle pouvant expliquer le mécanisme d'action de DAP12 lors de la phagocytose via les Fc $\gamma$ RI. Selon ce modèle, la phosphorylation différentielle des deux résidus tyrosines de l'ITAM de DAP12 générerait des signaux opposés. Ce modèle s'appuie sur l'observation que les ITAMs peuvent initier des signaux inhibiteurs sous certaines conditions de phosphorylation [44]. Par exemple, il a été démontré que la phosphorylation partielle des multiples ITAMs de la chaîne  $\zeta$  du TCR peut inhiber la signalisation via ce récepteur [160]. D'après le modèle que nous proposons, une molécule inhibitrice pourrait être associée au premier résidu tyrosine de l'ITAM non-phosphorylé de DAP12 (Y65) dans le macrophage de type sauvage au repos (voir figure D1). En accord avec cette hypothèse, il a été démontré qu'une protéine phosphorylée d'environ 50 à 60 kDa s'associe uniquement avec les protéines DAP12 ne possédant pas de second résidu tyrosine dans leur ITAM [2]. Un faible niveau constitutif de phosphorylation du premier résidu

tyrosine de l'ITAM pourrait servir à recruter des protéines possédant un domaine SH2. Mentionnons de plus que la séquence d'acides aminés entourant le premier résidu tyrosine de l'ITAM de DAP12 (SPYQEL) correspond à la séquence consensus d'un ITIM. Il est donc possible que l'inhibiteur associé à DAP12 soit une protéine normalement associée à ces motifs, telles par



**Figure D :** Mécanisme d'action proposé pour DAP12 lors de la phagocytose via FcγRI

exemple les phosphatases SHP-1 ou SHIP. À la suite de la phosphorylation de l'ITAM de DAP12, la PTK Syk sera recrutée pour s'y lier via ses domaines SH2 (voir figure D2). L'inhibiteur serait ainsi déplacé de la portion cytoplasmique de DAP12 par l'arrivée de Syk. Il serait alors libre et pourrait inhiber certaines molécules environnantes, dont des molécules impliquées dans la phagocytose via les récepteurs FcγRI. Puisque les clones Flag-DAP12-Y76F ne possèdent pas le deuxième résidu tyrosine, l'inhibiteur ne peut donc être déplacé car le recrutement de la PTK Syk n'a pas lieu. L'effet inhibiteur est par conséquent absent chez ces clones et ils ingèrent les IgG2a-SRBC avec plus d'efficacité.

Une molécule inhibitrice candidate serait entre autres la PTK inhibitrice Fgr, une protéine qui inhibe la phagocytose via les FcγR chez le macrophage et la signalisation via les intégrines β2 chez les cellules myéloïdes [109, 167]. La PTK Fgr s'associe à SIRPα chez les cellules myéloïdes humaines [109]. Ce récepteur est la contrepartie inhibitrice du récepteur SIRPβ-1 [8]. La PTK Fgr n'est pas essentielle à la phagocytose, mais elle est recrutée aux domaines d'agrégation des récepteurs phagocytaires. Une fois recrutée, elle atténue ensuite la phagocytose en freinant la réorganisation du cytosquelette et en inhibant l'activation de la PTK Syk. La régulation négative effectuée par Fgr est indépendante de la fonction kinase de cette enzyme [109, 167]. L'association de DAP12 avec Fgr n'a pas été étudiée dans notre modèle. Par contre, si elle a lieu, cette association pourrait expliquer l'inhibition de la formation de coupes d'actine par DAP12 endogène. Toutefois, nous n'avons pu observer de différences dans la phosphorylation de la PTK Syk chez les clones suite à la phagocytose d'IgG2a-SRBC. L'inhibition de la PTK Syk par la PTK Fgr n'est donc probablement pas responsable de l'augmentation de la phagocytose que nous observons chez les clones Flag-DAP12-Y76F.

Le modèle que nous proposons afin d'expliquer le rôle inhibiteur de DAP12 présuppose que, lors de l'ingestion de la particule opsonisée, les complexes récepteur/DAP12 impliqués dans la régulation de cet événement co-localisent avec les récepteurs phagocytaires. Nous n'avons malheureusement pas pu détecter jusqu'à présent la co-localisation ni la re-localisation de DAP12 au site d'ingestion. Cet événement pourrait toutefois s'avérer de très courte durée et donc assez difficile à détecter. Par contre, nous avons pu démontrer que DAP12 est spécifiquement et directement impliqué dans la phagocytose d'IgG2a-SRBC grâce à l'observation du changement de conformation de DAP12 lors de ce processus. En effet, lors de l'ingestion d'IgG2a-SRBC, nous détectons l'apparition de dimères de DAP12 qui sont stables en présence de SDS et en absence de ponts disulfure pour les relier. Un motif de dimérisation semblable à celui retrouvé chez la glycophorine A est retrouvé dans le domaine transmembranaire de DAP12 (GIxxGDxxL) [162, 163]. Cette séquence est probablement responsable de cette stabilisation des dimères DAP12.

Il est possible que DAP12 entre en compétition avec les récepteurs FcγRI pour l'association avec certaines PTK de la famille Src. Les PTK de la famille Src favorisent la polymérisation de l'actine et la formation de coupes d'actine lors de la phagocytose. Cette fonction semble indépendante du recrutement et de l'activation de la PTK Syk [99]. L'implication de la PTK Syk dans la polymérisation de l'actine est présentement controversée puisque des résultats contradictoires ont été obtenus en ce qui concerne la polymérisation de l'actine chez des macrophages Syk<sup>-/-</sup>. En effet, la formation de coupes d'actine sous les particules opsonisées est observée sous les FcγR des macrophages Syk<sup>-/-</sup> [101], mais certains ont rapporté que cette polymérisation n'a pas lieu chez les macrophages Syk<sup>-/-</sup> stimulés avec des IgG [168]. De plus, la formation de coupes d'actine suite à l'agrégation des FcγR chez les

lymphocytes semble nécessiter la présence de la PTK Syk [158]. Un mécanisme de polymérisation de l'actine indépendant de Syk et reposant sur l'activité des PTK de la famille Src a néanmoins été proposé. En effet, des macrophages dérivés de la moelle osseuse qui n'expriment pas les PTK de la famille Src Hck, Fgr et Lyn réorganisent leur cytosquelette beaucoup plus lentement lors de la phagocytose de particules opsonisées avec des IgG [99]. Une compétition entre les ITAM de DAP12 endogène et des FcγRI pour certaines PTK de la famille Src lors de la phagocytose pourrait par conséquent influencer les cinétiques d'internalisation des particules opsonisées en causant des délais significatifs dans la formation de coupes d'actine. L'effet de DAP12 sur la phagocytose via les FcγRI serait donc indépendant de l'activation des cascades de signalisation engendrées par Syk. Si cette hypothèse de compétition pour l'association avec les PTK de la famille Src s'avère la bonne, nous pourrions par la même occasion affirmer que l'interaction entre DAP12 et ces PTK nécessite un ITAM fonctionnel. En effet, lorsqu'un des deux résidus tyrosines du motif est muté, l'effet inhibiteur est absent puisque la séquestration de ces PTK par DAP12 ne pourra avoir lieu.

Les petites GTPases de la famille Rho (Rho/Rac/Cdc42) sont aussi impliquées dans la polymérisation de l'actine lors de la phagocytose via les FcγR [122]. En effet, la protéine RhoA est essentielle lors de ce processus et les protéines Rac1 et Cdc42 sont toutes deux nécessaires pour la formation optimale des coupes d'actine [92, 123, 124]. Les mécanismes régulant l'activité de ces GTPases sont peu connus. Il sera donc important de vérifier le rôle de DAP12 dans l'activation de ces GTPases afin de mieux comprendre l'effet de DAP12 sur la polymérisation de l'actine.

Chez les cellules NK, la très grande majorité des récepteurs associés à DAP12 possèdent une contrepartie inhibitrice [37]. Lors de l'interaction des récepteurs activateurs associés à DAP12 avec les mêmes ligands que leur contrepartie inhibitrice, un équilibre précis de signaux activateurs et inhibiteurs est atteint et régule les fonctions cytotoxiques des cellules NK [170]. Jusqu'à présent, aucun homologue inhibiteur n'a encore été identifié pour les récepteurs associés à DAP12 exprimés chez les cellules myéloïdes murines. Toutefois, la présence de ces récepteurs inhibiteurs ne peut être complètement écartée. Ceci soulève par conséquent des hypothèses sur les mécanismes de régulation des fonctions phagocytaires chez ces cellules. Il n'est pas impossible que, dans notre modèle, une inhibition partielle de la signalisation via DAP12 grâce à la surexpression de Flag-DAP12-Y76F puisse interférer dans la balance précise des signaux activateurs et inhibiteurs régulant la phagocytose. Cette inhibition partielle ne causerait pas forcément l'inhibition des fonctions phagocytaires de la cellule.

Il a été démontré que, lors de la phagocytose, l'inhibition de la polymérisation de l'actine par l'ajout de la cytochalasine D empêche l'internalisation mais non l'attachement des particules opsonisées [29, 164]. Puisque nous observons une augmentation de l'attachement des IgG2a-SRBC chez les clones Flag-DAP12-Y76F, la modulation de la polymérisation de l'actine n'est manifestement pas la seule fonction exercée par DAP12 lors de la phagocytose via les FcγRI. De plus, chez des macrophages *Syk*<sup>-/-</sup> ou chez des macrophages n'exprimant pas certaines les PTK de la famille Src, aucune modification de l'attachement des IgG-SRBC n'est observée par rapport aux capacités d'attachement des macrophages normaux [99, 101]. Par conséquent, la modulation de l'activation de ces PTK n'est pas non plus responsable pour l'augmentation de l'attachement d'IgG2a-SRBC observées chez les clones Flag-DAP12-

Y76F. L'implication de DAP12 dans d'autres étapes de la phagocytose devra ainsi être étudiée. Parmi ces étapes, notons l'affinité de liaison des FcγRI à leurs ligand, la stabilisation des complexes ligand/FcγRI à la surface et l'agrégation de ces récepteurs à la membrane. En effet, il a été démontré que l'affinité de FcγRI pour son ligand est augmentée de cinq fois lorsque la chaîne γ est co-transfectée avec la chaîne FcγRIα dans des cellules COS [89]. Puisque des interactions intracytoplasmiques peuvent modifier ainsi la structure et l'affinité de liaison du domaine extracellulaire de FcγRI, DAP12 pourrait influencer l'attachement des IgG2a-SRBC grâce à des mécanismes intracellulaires encore inconnus.

DAP12 pourrait en outre agir sur des protéines en aval de Syk qui sont impliquées dans la phagocytose, telle la PI 3-kinase. Cette dernière est requise lors de la phagocytose via les FcγR [107, 116] et serait impliquée dans la fermeture du phagosome [169]. L'extension de pseudopodes et l'effet de DAP12 sur l'activité de la PI 3-kinase devront donc être étudiés afin de bien cerner l'impact de DAP12 dans toutes les étapes de la phagocytose via les FcγRI.

Ce projet de recherche nous a permis de mettre en évidence un rôle pour DAP12 dans la phagocytose via les FcγRI chez le macrophage. La participation de DAP12 dans cette fonction critique confirme, en concert avec plusieurs études récentes portant sur le rôle de DAP12 chez les cellules myéloïdes, que cette protéine influence de façon capitale la régulation de l'activation de ces cellules. En effet, lors de l'étude de souris DAP12<sup>-/-</sup> et de patients humains atteints de la maladie Nasu-Hakola, plusieurs symptômes observés semblent la conséquence de l'absence de DAP12 chez les cellules myéloïdes plutôt que chez les cellules NK [24, 25, 66, 76]. Par contre, les connaissances acquises jusqu'à présent sur le rôle de DAP12 dans les fonctions de ces cellules ne peuvent complètement expliquer tous les effets observés chez les souris et humains DAP12<sup>-/-</sup>. Des études supplémentaires sont donc

nécessaires afin de connaître la totalité des fonctions modulées par DAP12.

L'étude de DAP12 est relativement compliquée par le fait que cette protéine s'associe simultanément à plusieurs récepteurs différents qui peuvent être exprimés simultanément à la surface de la même cellule. De plus, de nombreuses protéines associées à DAP12 et exprimées chez les cellules myéloïdes n'ont toujours pas été identifiées. Il est par conséquent impossible pour l'instant de déterminer lequel de ces récepteurs associés à DAP12 est responsable des effets observés lors de la phagocytose via les Fc $\gamma$ RI dans notre modèle. L'identification et la caractérisation de molécules à la fois associées à DAP12 et impliquées dans la phagocytose via les Fc $\gamma$ RI facilitera la compréhension du rôle de la protéine DAP12 dans ce processus.



## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier Marcel Desrosiers, autant pour son aide inestimable lors de mes expériences en microscopie et en imagerie que pour les grandes discussions pendant les longs moments d'attente devant l'écran d'ordinateur.

Je remercie également ma directrice de recherche Pascale Duplay ainsi que mon co-directeur Albert Descoteaux pour leur accueil, leur expertise, leurs conseils judicieux, leur temps et leur patience. J'ai énormément appris.

Aussi, je remercie chaleureusement tous les membres des laboratoires Duplay et Descoteaux, qui ont contribué à rendre mon passage à l'INRS-IAF des plus agréables.

Enfin, merci à la Fondation Armand-Frappier pour son soutien financier.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Lanier, L.L., et al., *Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells*. *Nature*, 1998. **391**(6668): p. 703-7.
2. Tomasello, E., et al., *Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(51): p. 34115-9.
3. Campbell, K.S., et al., *Signaling through human killer cell activating receptors triggers tyrosine phosphorylation of an associated protein complex*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(2): p. 599-609.
4. Smith, K.M., et al., *Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors*. *J Immunol*, 1998. **161**(1): p. 7-10.
5. McVicar, D.W., et al., *DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(49): p. 32934-42.
6. Vitale, M., et al., *NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis*. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 2065-72.
7. Makrigiannis, A.P., et al., *Cloning and characterization of a novel activating Ly49 closely related to Ly49A*. *J Immunol*, 1999. **163**(9): p. 4931-8.
8. Tomasello, E., et al., *Association of signal-regulatory proteins beta with KARAP/DAP-12*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(8): p. 2147-56.

9. Mason, L.H., et al., *Interaction of Ly-49D+ NK cells with H-2Dd target cells leads to DAP-12 phosphorylation and IFN-gamma secretion.* J Immunol, 2000. **164**(2): p. 603-11.
10. Biassoni, R., et al., *The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions.* J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 645-50.
11. Olcese, L., et al., *Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells.* J Immunol, 1997. **158**(11): p. 5083-6.
12. Houchins, J.P., et al., *Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C.* J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3603-9.
13. Lanier, L.L., et al., *Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors.* Immunity, 1998. **8**(6): p. 693-701.
14. Mason, L.H., et al., *Characterization of an associated 16-kDa tyrosine phosphoprotein required for Ly-49D signal transduction.* J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4148-52.
15. Gosselin, P., et al., *Induction of DAP12 phosphorylation, calcium mobilization, and cytokine secretion by Ly49H.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(1): p. 165-71.
16. Bottino, C., et al., *Identification and molecular characterization of a natural mutant of the p50.2/KIR2DS2 activating NK receptor that fails to mediate NK cell triggering.* Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3569-74.

17. Makrigiannis, A.P., et al., *Identification of the Ly49L protein: evidence for activating counterparts to inhibitory Ly49 proteins*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(5): p. 765-71.
18. Silver, E.T., et al., *Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H-2D(k) and H-2D(d)*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2333-41.
19. Bakker, A.B., et al., *Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9792-6.
20. Bouchon, A., J. Dietrich, and M. Colonna, *Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 4991-5.
21. Daws, M.R., et al., *Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 783-91.
22. Chung, D.H., W.E. Seaman, and M.R. Daws, *Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17*. Eur J Immunol, 2002. **32**(1): p. 59-66.
23. Aoki, N., et al., *The role of the DAP12 signal in mouse myeloid differentiation*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3790-6.
24. Bakker, A.B., et al., *DAP12-deficient mice fail to develop autoimmunity due to impaired antigen priming*. Immunity, 2000. **13**(3): p. 345-53.

25. Tomasello, E., et al., *Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice*. *Immunity*, 2000. **13**(3): p. 355-64.
26. Bouchon, A., et al., *TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1103-7.
27. Nathan, C. and A. Ding, *TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome*. *Nat Med*, 2001. **7**(5): p. 530-2.
28. Bouchon, A., et al., *A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells*. *J Exp Med*, 2001. **194**(8): p. 1111-22.
29. Lowry, M.B., et al., *Functional separation of pseudopod extension and particle internalization during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis*. *J Exp Med*, 1998. **187**(2): p. 161-76.
30. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 593-623.
31. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 275-90.
32. Reth, M., *Antigen receptor tail clue*. *Nature*, 1989. **338**(6214): p. 383-4.
33. Malissen, B. and A.M. Schmitt-Verhulst, *Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex*. *Curr Opin Immunol*, 1993. **5**(3): p. 324-33.
34. Weiss, A. and D.R. Littman, *Signal transduction by lymphocyte antigen receptors*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 263-74.

35. Irving, B.A. and A. Weiss, *The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways*. Cell, 1991. **64**(5): p. 891-901.
36. Bottino, C., et al., *A novel surface molecule homologous to the p58/p50 family of receptors is selectively expressed on a subset of human natural killer cells and induces both triggering of cell functions and proliferation*. Eur J Immunol, 1996. **26**(8): p. 1816-24.
37. Lanier, L.L., *NK cell receptors*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.
38. Cantoni, C., et al., *NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 787-96.
39. Makrigiannis, A.P. and S.K. Anderson, *Ly49 gene expression in different inbred mouse strains*. Immunol Res, 2000. **21**(1): p. 39-47.
40. Campbell, K.S. and M. Colonna, *DAP12: a key accessory protein for relaying signals by natural killer cell receptors*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(6): p. 631-6.
41. Brumbaugh, K.M., et al., *Clonotypic differences in signaling from CD94 (kp43) on NK cells lead to divergent cellular responses*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2804-12.
42. Carretero, M., et al., *Mitogen-activated protein kinase activity is involved in effector functions triggered by the CD94/NKG2-C NK receptor specific for HLA-E*. Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 2842-8.
43. Chu, D.H., C.T. Morita, and A. Weiss, *The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development*. Immunol Rev, 1998. **165**: p. 167-80.



44. Love, P.E. and E.W. Shores, *ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go?* *Immunity*, 2000. **12**(6): p. 591-7.
45. Aoki, N., et al., *DAP12 ITAM motif regulates differentiation and apoptosis in M1 leukemia cells.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **291**(2): p. 296-304.
46. Colonna, M. and J. Samaridis, *Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells.* *Science*, 1995. **268**(5209): p. 405-8.
47. Sivori, S., et al., *CD94 functions as a natural killer cell inhibitory receptor for different HLA class I alleles: identification of the inhibitory form of CD94 by the use of novel monoclonal antibodies.* *Eur J Immunol*, 1996. **26**(10): p. 2487-92.
48. Sivori, S., et al., *Inhibitory CD94 molecules identified by the Z199 monoclonal antibody recognize different HLA-class I molecules.* *Transplant Proc*, 1996. **28**(6): p. 3199-203.
49. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.* *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
50. Smith, H.R., F.M. Karlhofer, and W.M. Yokoyama, *Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated NK cells.* *J Immunol*, 1994. **153**(3): p. 1068-79.
51. Brennan, J., et al., *Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties.* *J Exp Med*, 1994. **180**(6): p. 2287-95.
52. Burshtyn, D.N., et al., *Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor.* *Immunity*, 1996. **4**(1): p. 77-85.

53. Olcese, L., et al., *Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases*. J Immunol, 1996. 156(12): p. 4531-4.
54. Houchins, J.P., et al., *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, 1991. 173(4): p. 1017-20.
55. Lazetic, S., et al., *Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits*. J Immunol, 1996. 157(11): p. 4741-5.
56. Moretta, A., et al., *Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells*. J Exp Med, 1995. 182(3): p. 875-84.
57. Mandelboim, O., et al., *Enhancement of class II-restricted T cell responses by costimulatory NK receptors for class I MHC proteins*. Science, 1996. 274(5295): p. 2097-100.
58. Janeway, C.A., Jr. and P. Travers, *Immunobiology : the immune system in health and disease*. Third ed. 1997, London: Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.
59. Kharitononkov, A., et al., *A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors*. Nature, 1997. 386(6621): p. 181-6.
60. Adams, S., et al., *Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells*. J Immunol, 1998. 161(4): p. 1853-9.

61. Veillette, A., E. Thibaudeau, and S. Latour, *High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22719-28.
62. Lienard, H., et al., *Signal regulatory proteins negatively regulate immunoreceptor-dependent cell activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32493-9.
63. Fujioka, Y., et al., *A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6887-99.
64. Seiffert, M., et al., *Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3633-43.
65. Pekkarinen, P., et al., *Assignment of the locus for PLO-SL, a frontal-lobe dementia with bone cysts, to 19q13*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(2): p. 362-72.
66. Paloneva, J., et al., *Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 357-61.
67. Hakola, H.P., O.H. Jarvi, and P. Sourander, *Osteodysplasia polycystica hereditaria combined with sclerosing leucoencephalopathy, a new entity of the dementia praesentis group*. Acta Neurol Scand, 1970. **46**: p. Suppl 43:79+.
68. Hakola, H.P., *Neuropsychiatric and genetic aspects of a new hereditary disease characterized by progressive dementia and lipomembranous polycystic osteodysplasia*. Acta Psychiatr Scand Suppl, 1972. **232**: p. 1-173.
69. Nasu, T., Y. Tsukahara, and K. Terayama, *A lipid metabolic disease-"membranous lipodystrophy"-an autopsy case demonstrating numerous peculiar*

*membrane-structures composed of compound lipid in bone and bone marrow and various adipose tissues. Acta Pathol Jpn, 1973. 23(3): p. 539-58.*

70. Makela, P., et al., *Radiologic bone changes of polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy. Skeletal Radiol, 1982. 8(1): p. 51-4.*

71. Iivanainen, M., et al., *Cerebral MR and CT imaging in polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy. J Comput Assist Tomogr, 1984. 8(5): p. 940-3.*

72. Hakola, H.P., P. Karjalainen, and P. Virtama, *Bone scintigraphy in polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy. Nucl Med Commun, 1988. 9(12): p. 1005-11.*

73. Hakola, H.P. and M. Puranen, *Neuropsychiatric and brain CT findings in polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy. Acta Neurol Scand, 1993. 88(5): p. 370-5.*

74. Kalimo, H., et al., *Vascular changes and blood-brain barrier damage in the pathogenesis of polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy (membranous lipodystrophy). Acta Neurol Scand, 1994. 89(5): p. 353-61.*

75. Verloes, A., et al., *Nasu-Hakola syndrome: polycystic lipomembranous osteodysplasia with sclerosing leukoencephalopathy and presenile dementia. J Med Genet, 1997. 34(9): p. 753-7.*

76. Paloneva, J., et al., *CNS manifestations of Nasu-Hakola disease: a frontal dementia with bone cysts. Neurology, 2001. 56(11): p. 1552-8.*

77. Adams, D.O. and T.A. Hamilton, *The cell biology of macrophage activation*. Annu Rev Immunol, 1984. **2**: p. 283-318.
78. Auger, M.J. and J.A. Ross, in *The biology of macrophages*, E. Lewis and J. McGee, Editors. 1992, Oxford University Press. p. 3-27.
79. Daeron, M., *Fc receptor biology*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 203-34.
80. Cambier, J.C., *New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL)*. Immunol Today, 1995. **16**(2): p. 110.
81. Orloff, D.G., et al., *Family of disulphide-linked dimers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors*. Nature, 1990. **347**(6289): p. 189-91.
82. Cosson, P., et al., *Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 414-6.
83. Greenberg, S., *Fc Receptor-mediated Phagocytosis*, in *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles*. 1999, JAI Press Inc. p. 149-191.
84. Sanchez-Mejorada, G. and C. Rosales, *Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(5): p. 521-33.
85. Anderson, C.L., et al., *Monoclonal antibodies to Fc receptors for IgG on human mononuclear phagocytes. Antibody characterization and induction of superoxide production in a monocyte cell line*. J Biol Chem, 1986. **261**(27): p. 12856-64.
86. Debets, J.M., et al., *Fc-receptor cross-linking induces rapid secretion of tumor necrosis factor (cachectin) by human peripheral blood monocytes*. J Immunol, 1988. **141**(4): p. 1197-201.

87. Allen, J.M. and B. Seed, *Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs*. Science, 1989. **243**(4889): p. 378-81.
88. Takai, T., et al., *FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects*. Cell, 1994. **76**(3): p. 519-29.
89. Miller, K.L., A.M. Duchemin, and C.L. Anderson, *A novel role for the Fc receptor gamma subunit: enhancement of Fc gamma R ligand affinity*. J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2227-33.
90. Indik, Z.K., et al., *Insertion of cytoplasmic tyrosine sequences into the nonphagocytic receptor Fc gamma RIIB establishes phagocytic function*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2072-80.
91. Sears, D.W., et al., *Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fc receptor for IgG*. J Immunol, 1990. **144**(1): p. 371-8.
92. Hackam, D.J., et al., *Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fc gamma receptors in macrophages*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 955-66.
93. Laudanna, C., J.J. Campbell, and E.C. Butcher, *Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins*. Science, 1996. **271**(5251): p. 981-3.
94. Arnaout, M.A., et al., *Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mol)*. J Clin Invest, 1983. **72**(1): p. 171-9.

95. Zhang, Q., et al., *A requirement for ARF6 in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages.* J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 19977-81.
96. Davis, W., et al., *Two distinct regions of FC gamma RI initiate separate signalling pathways involved in endocytosis and phagocytosis.* Embo J, 1995. **14**(3): p. 432-41.
97. Suzuki, T., et al., *Differential involvement of Src family kinases in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis.* J Immunol, 2000. **165**(1): p. 473-82.
98. Greenberg, S., *Modular components of phagocytosis.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(5): p. 712-7.
99. Fitzer-Attas, C.J., et al., *Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn.* J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 669-82.
100. Cooper, J.A. and B. Howell, *The when and how of Src regulation.* Cell, 1993. **73**(6): p. 1051-4.
101. Crowley, M.T., et al., *A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages.* J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1027-39.
102. Newman, S.L., L.K. Mikus, and M.A. Tucci, *Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor- and Fc receptor-mediated phagocytosis.* J Immunol, 1991. **146**(3): p. 967-74.
103. Zheleznyak, A. and E.J. Brown, *Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes.* J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 12042-8.

104. Karimi, K. and M.R. Lennartz, *Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5786-94.
105. Zheng, L., et al., *Role of protein kinase C isozymes in Fc gamma receptor-mediated intracellular killing of Staphylococcus aureus by human monocytes*. J Immunol, 1995. **155**(2): p. 776-84.
106. Breton, A. and A. Descoteaux, *Protein kinase C-alpha participates in Fc gamma R-mediated phagocytosis in macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(2): p. 472-6.
107. Cox, D., et al., *A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1240-7.
108. Barker, S.A., et al., *Wortmannin blocks lipid and protein kinase activities associated with PI 3-kinase and inhibits a subset of responses induced by Fc epsilon R1 cross-linking*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(9): p. 1145-58.
109. Gresham, H.D., et al., *Negative regulation of phagocytosis in murine macrophages by the Src kinase family member, Fgr*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 515-28.
110. Matozaki, T. and M. Kasuga, *Roles of protein-tyrosine phosphatases in growth factor signalling*. Cell Signal, 1996. **8**(1): p. 13-9.
111. Huber, M., et al., *The role of the SRC homology 2-containing inositol 5'-phosphatase in Fc epsilon R1-induced signaling*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **244**: p. 29-41.



112. Cox, D., et al., *A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc gamma receptors and complement receptor 3 (alpha(M)beta(2); CD11b/CD18)*. J Exp Med, 2001. **193**(1): p. 61-71.
113. Edberg, J.C., et al., *The cytoplasmic domain of human FcgammaRIa alters the functional properties of the FcgammaRI.gamma-chain receptor complex*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30328-33.
114. Quilliam, A.L., et al., *Biochemical characterization of murine Fc gamma RI*. Immunology, 1993. **78**(3): p. 358-63.
115. Griffin, F.M., Jr., et al., *Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane*. J Exp Med, 1975. **142**(5): p. 1263-82.
116. Melendez, A.J., et al., *Aggregation of the human high affinity immunoglobulin G receptor (FcgammaRI) activates both tyrosine kinase and G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase isoforms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2169-74.
117. Whitman, M., et al., *Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate*. Nature, 1988. **332**(6165): p. 644-6.
118. Harlan, J.E., et al., *Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*. Nature, 1994. **371**(6493): p. 168-70.

119. Harlan, J.E., et al., *Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. *Biochemistry*, 1995. **34**(31): p. 9859-64.
120. Greenberg, S., K. Burridge, and S.C. Silverstein, *Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages*. *J Exp Med*, 1990. **172**(6): p. 1853-6.
121. Cooper, J.A., *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. *J Cell Biol*, 1987. **105**(4): p. 1473-8.
122. Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki, *Small GTP-binding proteins*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(1): p. 153-208.
123. Cox, D., et al., *Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes*. *J Exp Med*, 1997. **186**(9): p. 1487-94.
124. Massol, P., et al., *Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1*. *Embo J*, 1998. **17**(21): p. 6219-29.
125. Caron, E. and A. Hall, *Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases*. *Science*, 1998. **282**(5394): p. 1717-21.
126. Coso, O.A., et al., *The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway*. *Cell*, 1995. **81**(7): p. 1137-46.
127. Minden, A., et al., *Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs*. *Cell*, 1995. **81**(7): p. 1147-57.

128. Abo, A., et al., *Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1*. *Nature*, 1991. **353**(6345): p. 668-70.
129. Gabig, T.G., et al., *Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation*. *Blood*, 1995. **85**(3): p. 804-11.
130. Chong, L.D., et al., *The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells*. *Cell*, 1994. **79**(3): p. 507-13.
131. Hawkins, P.T., et al., *PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase*. *Curr Biol*, 1995. **5**(4): p. 393-403.
132. Arber, S., et al., *Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase*. *Nature*, 1998. **393**(6687): p. 805-9.
133. Yang, N., et al., *Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization*. *Nature*, 1998. **393**(6687): p. 809-12.
134. Moon, A. and D.G. Drubin, *The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics*. *Mol Biol Cell*, 1995. **6**(11): p. 1423-31.
135. Hartwig, J.H., et al., *Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets*. *Cell*, 1995. **82**(4): p. 643-53.
136. Arcaro, A., *The small GTP-binding protein Rac promotes the dissociation of gelsolin from actin filaments in neutrophils*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(2): p. 805-13.
137. Erickson, J.W., et al., *Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(43): p. 26850-4.

138. Ridley, A.J., *Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking*. Traffic, 2001. 2(5): p. 303-10.
139. Swanson, J.A., et al., *A contractile activity that closes phagosomes in macrophages*. J Cell Sci, 1999. 112 ( Pt 3): p. 307-16.
140. Wigge, P., Y. Vallis, and H.T. McMahon, *Inhibition of receptor-mediated endocytosis by the amphiphysin SH3 domain*. Curr Biol, 1997. 7(8): p. 554-60.
141. Gold, E.S., et al., *Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages*. J Exp Med, 1999. 190(12): p. 1849-56.
142. Gold, E.S., et al., *Amphiphysin II $\alpha$ , a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis*. Immunity, 2000. 12(3): p. 285-92.
143. Herskovits, J.S., et al., *Effects of mutant rat dynamin on endocytosis*. J Cell Biol, 1993. 122(3): p. 565-78.
144. van der Blik, A.M., et al., *Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation*. J Cell Biol, 1993. 122(3): p. 553-63.
145. Damke, H., et al., *Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation*. J Cell Biol, 1994. 127(4): p. 915-34.
146. Damke, H., et al., *Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin*. J Cell Biol, 1995. 131(1): p. 69-80.
147. Desjardins, M., et al., *Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus*. J Cell Biol, 1994. 124(5): p. 677-88.

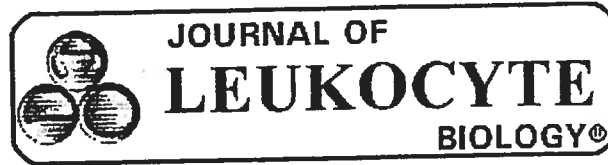
148. Meresse, S., J.P. Gorvel, and P. Chavrier, *The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes*. J Cell Sci, 1995. **108** ( Pt 11): p. 3349-58.
149. Vitelli, R., et al., *Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4391-7.
150. Desjardins, M., et al., *Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes*. J Cell Sci, 1997. **110** ( Pt 18): p. 2303-14.
151. Emans, N., N.N. Nzala, and M. Desjardins, *Protein phosphorylation during phagosome maturation*. FEBS Lett, 1996. **398**(1): p. 37-42.
152. Dietrich, J., et al., *Cutting edge: signal-regulatory protein beta 1 is a DAP12-associated activating receptor expressed in myeloid cells*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 9-12.
153. Stacey, K.J., I.L. Ross, and D.A. Hume, *Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages*. Immunol Cell Biol, 1993. **71**(Pt 2): p. 75-85.
154. St-Denis, A., et al., *Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line*. J Biol Chem, 1998. **273**(49): p. 32787-92.
155. Descoteaux, A. and G. Matlashewski, *Regulation of tumor necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumor necrosis factor*. J Immunol, 1990. **145**(3): p. 846-53.
156. Perez-Villar, J.J., et al., *Functional ambivalence of the Kp43 (CD94) NK cell-associated surface antigen*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 5779-88.

157. Greenberg, S., P. Chang, and S.C. Silverstein, *Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 529-34.
158. Cox, D., et al., *Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly*. J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16597-602.
159. Walker, W.S., *Separate Fc-receptors for immunoglobulins IgG2a and IgG2b on an established cell line of mouse macrophages*. J Immunol, 1976. **116**(4): p. 911-4.
160. Kersh, E.N., G.J. Kersh, and P.M. Allen, *Partially phosphorylated T cell receptor zeta molecules can inhibit T cell activation*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1627-36.
161. Vines, C.M., et al., *Inhibition of beta 2 integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr*. Immunity, 2001. **15**(4): p. 507-19.
162. Mingarro, I., A. Elofsson, and G. von Heijne, *Helix-helix packing in a membrane-like environment*. J Mol Biol, 1997. **272**(4): p. 633-41.
163. Bolliger, L. and B. Johansson, *Identification and functional characterization of the zeta-chain dimerization motif for TCR surface expression*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3867-76.
164. Greenberg, S., et al., *Ca(2+)-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages*. J Cell Biol, 1991. **113**(4): p. 757-67.
165. Heyman, B., *Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 709-37.

166. Wernersson, S., et al., *IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 618-22.
167. Vines, C.M., et al., *Inhibition of beta 2 integrin receptor and Syk kinase signaling in monocytes by the Src family kinase Fgr*. *Immunity*, 2001. **15**(4): p. 507-19.
168. Cox, D. and S. Greenberg, *Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system*. *Semin Immunol*, 2001. **13**(6): p. 339-45.
169. Araki, N., M.T. Johnson, and J.A. Swanson, *A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(5): p. 1249-60.
170. Moretta, A., et al., *Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells*. *Semin Immunol*, 2000. **12**(2): p. 129-38.

## **ANNEXE I**




[Home](#)

<b>Manuscript #</b>	J0602-307
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	2002-06-17 11:46:59
<b>Current Stage</b>	Waiting for Potential Section Editor Assignment
<b>Title</b>	DAP12 negatively regulates FcγRI-mediated phagocytosis in RAW 264.7 macrophages
<b>Running Title</b>	DAP12-mediated inhibition of phagocytosis
<b>Manuscript Type</b>	Full Length Manuscript
<b>Corresponding Author</b>	Pascale Duplay (INRS-Institut Armand-Frappier)
<b>Contributing Authors</b>	Angélique Longtin, Albert Descoteaux, Pascale Duplay
<b>Abstract</b>	In myeloid cells, function of DAP12 and its associated receptors (MDL-1, SIRPb-1, TREM-1, TREM-2 and TREM-3) remains speculative. Here, we have investigated the role of DAP12 in phagocytosis by generating stable transfectants of the macrophage cell line RAW 264.7 expressing a wild-type (Flag-DAP12) or a version of DAP12 containing a mutation in its ITAM (Flag-DAP12-Y76F). Our data indicate that phagocytosis of IgG2a-opsonized sheep red blood cells (IgG2a-SRBC) by Flag-DAP12-Y76F clones was significantly increased when compared with Flag-DAP12 cells. This was both the consequence of increased binding and internalization rates. Polymerization of F-actin surrounding IgG2a-SRBC occurred faster in Flag-DAP12-Y76F clones than in Flag-DAP12 clones. Since phagocytosis of IgG2b-SRBC, IgG3-SRBC, as well as latex beads was not affected by the expression of Flag-DAP12-Y76F, our results suggest that DAP12 may be selectively involved in the negative regulation of FcγRI-mediated phagocytosis, possibly in part by down-modulating F-actin cup formation..
<b>Section Editor</b>	Not Assigned
<b>Reviewers</b>	Not Assigned
<b>Key Words</b>	ITAM, IgG2a, signal transduction, mouse

### Manuscript Items

1. Author Cover Letter File #1 [PDF \(54Kb\)](#)
2. Article File #1 [PDF \(179Kb\)](#)
3. Figure 1 - [PDF \(97Kb\)](#)
4. Figure 2 - [PDF \(28Kb\)](#)
5. Figure 3 - [PDF \(89Kb\)](#)
6. Figure 4 - [PDF \(42Kb\)](#)
7. Figure 5 - [PDF \(31Kb\)](#)
8. Figure 6 - [PDF \(24Kb\)](#)
9. Figure 7 - [PDF \(49Kb\)](#)
10. Figure 8 - [PDF \(148Kb\)](#)
11. Figure 9 - [PDF \(68Kb\)](#)
12. Merged File containing manuscript text and 9 figures [PDF \(746Kb\)](#)

**Subject: J0602-307 Receipt of New Paper by Journal of Leukocyte Biology**

**Date: Mon, 17 Jun 2002 12:09 -0400**

**From: [jleukbio@md.adelphia.net](mailto:jleukbio@md.adelphia.net)**

**To: [pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca)**

Dear Pascale Duplay,

On June 17, 2002, I received your manuscript entitled "DAP12 negatively regulates Fc(lower case gamma)RI-mediated phagocytosis in RAW 264.7 macrophages " by Pascale Duplay, Angélique Longtin, Albert Descoteaux, Pascale Duplay.

Your manuscript has been assigned the Paper #: J0602-307.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<http://www.jlb-submit.org/cgi-bin/main.plex?vms=1906-0-joyOK3nPOOnE2-11564-1>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your work to the Journal of Leukocyte Biology.

Sincerely,

Joost J. Oppenheim, M.D.  
Editor-In-Chief  
Journal of Leukocyte Biology  
103 Baughman's Lane, # 289  
Frederick, MD 21702