

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs par différentes populations leucocytaires**

Par

**MATHIEU PERRÉE**

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

**Jury d'évaluation**

<b>Examineur interne</b>	<b>Dr Denis Girard INRS-Institut Armand-Frappier</b>
<b>Examineur externe</b>	<b>Dr Malcolm Baines Université McGill</b>
<b>Directrice de recherche</b>	<b>Dr Suzanne Lemieux INRS-Institut Armand-Frappier</b>

## SOMMAIRE

Les récepteurs Ly49 murins constituent une grande famille de glycoprotéines de type II qui s'apparentent aux lectines de type C. Suite à leur interaction avec des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité, ils peuvent, selon la structure de leurs portions transmembranaire et intracytoplasmique, activer ou inhiber l'activité fonctionnelle des cellules qui les expriment. Bien que le premier récepteur Ly49 ait été initialement identifié sur une lignée de cellules T, ces molécules sont surtout associées aux cellules NK. Cependant, on sait aujourd'hui que des récepteurs Ly49 inhibiteurs sont aussi exprimés sur des cellules NKT et certains lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires. Le niveau d'expression des récepteurs Ly49 est modulé au cours de la différenciation cellulaire et également dans certaines conditions d'activation. Les travaux de différentes équipes, incluant ceux de notre laboratoire, ont établi que le niveau d'expression des récepteurs Ly49 détermine leur capacité de réguler l'activité cellulaire. Dans le présent travail, nous avons comparé l'expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs sur les cellules NK et sur différentes sous-populations de cellules T. Nos résultats montrent que la taille des populations de cellules positives et le niveau d'expression des récepteurs Ly49 varient non seulement pour chaque récepteur considéré, mais qu'ils diffèrent aussi selon le type de cellules qui l'expriment. Nous avons évalué l'effet de l'interleukine-2 (IL-2), l'IL-12 et l'IL-15 sur la modulation de l'expression des récepteurs d'inhibition reconnus par des anticorps qui réagissent avec Ly49A, C, C/I et G2. Les résultats démontrent que l'effet varie non seulement selon la cytokine utilisée, mais aussi selon le récepteur Ly49 étudié et le type de cellules qui l'expriment. Ces résultats suggèrent que les cytokines présentes dans l'environnement d'une cellule exprimant des récepteurs Ly49 pourraient donc être déterminantes dans la régulation de son activation en modulant l'expression de ses récepteurs Ly49 inhibiteurs, ce qui pourrait faire varier le niveau seuil auquel un signal d'activation serait perceptible.

Dans la deuxième partie du travail, nous avons amorcé la caractérisation de l'expression d'un autre récepteur Ly49 potentiellement inhibiteur, soit Ly49B. Celle-ci avait été freinée jusqu'à ce jour en raison de la non disponibilité d'un anticorps spécifique

à ce récepteur. Notre laboratoire ayant réussi à produire un tel réactif, nous avons pu établir que ce récepteur a une distribution très particulière. Nos travaux démontrent en effet que Ly49B est présent davantage dans la moelle osseuse que dans les autres organes. Contrairement aux autres récepteurs Ly49, Ly49B est surtout exprimé sur des cellules de la lignée myéloïde. Nous avons par ailleurs établi que son expression est fortement stimulée par l'IFN $\gamma$ . L'immunoprécipitation à partir de cellules Jurkat transfectées avec l'ADNc de Ly49B, d'une lignée de macrophages et de cellules fraîchement isolées de la moelle osseuse et de la cavité péritonéale de souris a confirmé que leur réactivité avec l'anticorps est bien due à la présence du récepteur Ly49B et non à une protéine différente exprimant un même épitope. De plus, cette protéine d'environ 90 kDa est exprimée sous forme d'homodimère à l'instar des autres membres de la famille Ly49. Nous n'avons pas réussi à déterminer le rôle que joue le récepteur Ly49B dans la régulation des fonctions des cellules myéloïdes. Toutefois, suite à une stimulation des cellules au pervanadate de sodium, nous avons pu observer le recrutement de la phosphatase SHP-1 prouvant ainsi la fonctionnalité de l'ITIM et le potentiel inhibiteur du récepteur Ly49B.

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier la Dre Suzanne Lemieux, ma directrice de recherche, pour m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire ainsi que pour l'encadrement qu'elle m'a apporté durant ces trois années.

Ensuite, je remercie Yvette Lusignan pour son support technique, pour ses réponses à mes questions ainsi que pour ses précieux conseils, même après sa retraite! Merci également à Marcel Desrosiers pour son aide et ses conseils pour la cytométrie en flux.

Je remercie également tous les gens que j'ai côtoyés à l'institut et qui ont contribué à rendre mon séjour des plus agréable.

Merci à toute ma famille pour leurs encouragements constants durant toutes ces années. De plus, un gros merci tout spécialement pour Annie qui a toujours été présente dans les bons comme les moins bons moments que nous avons vécus durant notre maîtrise.

Finalement, je tiens à remercier la Fondation Armand-Frappier pour son soutien financier.

## TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des figures et tableau.....	viii
Liste des abréviations.....	x
I. Introduction.....	1
II. Revue Bibliographique.....	3
1. Les récepteurs Ly49.....	3
1.1. Caractéristiques générales.....	3
1.2. Le complexe des gènes NK.....	3
1.3. Structure et fonctions des récepteurs Ly49.....	4
1.3.1. Homologies et diversité des récepteurs Ly49.....	4
1.3.2. Les récepteurs Ly49 inhibiteurs.....	6
1.3.3. Les récepteurs Ly49 activateurs.....	8
1.3.4. Les ligands des récepteurs Ly49.....	10
1.3.5. L'hypothèse du "missing self".....	14
1.4. Expression des récepteurs Ly49.....	15
1.4.1. Acquisition de l'expression des récepteurs Ly49.....	15
1.4.2. Régulation de l'expression des récepteurs Ly49.....	17
1.4.2.1. Régulation transcriptionnelle.....	17
1.4.2.2. Facteurs génétiques, âge et influence des CMH-I.....	19
1.5. Le récepteur Ly49B.....	22
2. Les cellules dont l'activité est régulée par des récepteurs Ly49 ou d'autres récepteurs d'inhibition.....	26
2.1. Les cellules NK.....	26
2.1.1. Définition, distribution et phénotype.....	26
2.1.2. Fonctions.....	27
2.1.2.1. Fonction cytotoxique.....	27
2.1.2.2. Fonction sécrétrice.....	29
2.2. Les cellules NKT.....	29
2.2.1. Définition, distribution et phénotype.....	29
2.2.2. Fonctions des cellules NKT.....	32
2.2.2.1. Fonction sécrétrice: immunomodulation.....	32
2.2.2.2. Prévention de maladies autoimmunes.....	33
2.2.2.3. Régulation de l'immunité anti-tumorale.....	34
2.2.2.4. Lutte contre des agents infectieux.....	35
2.3. Les cellules T CD8 <sup>+</sup> .....	35
2.4. Les cellules B-1.....	36
2.5. Les cellules de la lignée myéloïde.....	37
2.5.1. Les monocytes/macrophages.....	37
2.5.2. Les granulocytes polymorphonucléaires.....	38
2.5.3. Récepteurs d'inhibition exprimés par les cellules myéloïdes.....	39

3. Modulation de l'expression des récepteurs Ly49 et autres récepteurs associés aux cellules NK.....	41
3.1. Modulation lors d'infections.....	41
3.2. Modulation par des cytokines.....	43
4. Objectifs du projet.....	45
<b>III. Méthodologie.....</b>	<b>47</b>
1. Souris.....	47
2. Enrichissements cellulaires.....	47
2.1. Rate.....	47
2.2. Moelle osseuse.....	48
2.3. Thymus.....	48
2.4. Foie.....	49
2.5. Cavité péritonéale.....	49
3. Lignées cellulaires.....	49
4. Cytométrie en flux.....	50
4.1. Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux.....	50
4.2. Méthode d'analyse par cytométrie en flux.....	50
5. Cultures cellulaires.....	52
6. Production d'un anticorps monoclonal anti-Ly49B.....	54
6.1. Clonage d'hybridomes.....	54
6.2. Purification de l'anticorps 3LP218.....	55
6.3. Biotinylation des anticorps.....	56
6.4. Couplage des anticorps au FITC.....	56
7. Immunoprécipitation.....	57
8. Stimulation des cellules au pervanadate.....	58
9. Immunobuvardage de type western.....	58
10. Tests d'inhibition de l'activité fonctionnelle par le récepteur Ly49B.....	60
10.1. Dosage de l'oxyde nitrique.....	60
10.2. Phagocytose de billes.....	61
10.3. Cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC).....	62
11. Analyses statistiques.....	63
<b>IV. Résultats.....</b>	<b>64</b>
1. Expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs par différentes populations lymphocytaires de la rate.....	64
2. Modulation de l'expression des récepteurs Ly49 par des cytokines.....	68
2.1. Effet des cytokines sur l'expression des récepteurs Ly49 par les cellules NK spléniques et les lymphocytes T DN.....	70
3. Analyse de l'expression, des caractéristiques structurales et des propriétés fonctionnelles du récepteur Ly49B.....	74
3.1. Spécificité de l'anticorps 3LP218.....	74
3.2. Expression du récepteur Ly49B.....	76
3.2.1. Expression de récepteurs Ly49 par les cellules NK et les cellules T CD3 <sup>+</sup> DN spléniques de souris BALB/c.....	76
3.2.2. Expression du récepteur Ly49B dans la rate non enrichie.....	78
3.3. Expression du récepteur Ly49B dans d'autres organes.....	78

3.4. Phénotype des cellules de la moelle osseuse exprimant le récepteur Ly49B.....	81
3.5. Expression du récepteur Ly49B par les cellules de la cavité péritonéale.....	83
3.6. Comparaison de l'expression du récepteur Ly49B par différentes souches de souris.....	85
3.7. Expression du récepteur Ly49B par la lignée de macrophages RAW264.7 et modulation de son niveau d'expression.....	87
3.8. Caractérisation biochimique du récepteur Ly49B.....	89
3.9. Phosphorylation des tyrosines du récepteur Ly49B et recrutement de SHP-1.....	91
3.10. Tentative d'inhibition de l'activité fonctionnelle de macrophages via le récepteur Ly49B.....	93
3.10.1. Production de l'oxyde nitrique.....	93
3.10.2. Phagocytose.....	95
3.10.3. ADCC.....	95
V. Discussion.....	100
1. Expression comparée de récepteurs Ly49 inhibiteurs par les cellules NK et différentes sous-populations de cellules T et modulation par des cytokines.....	100
2. Propriétés du récepteur Ly49B.....	107
VI. Conclusion et perspectives.....	117
Liste des références.....	119

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

<b>Figure 1:</b>	Illustration schématique du complexe des gènes NK.....	5
<b>Figure 2:</b>	Structure schématique des récepteurs Ly49 inhibiteurs et activateurs.....	7
<b>Figure 3:</b>	Représentation schématique de l'analyse par cytométrie en flux permettant la comparaison de l'expression des récepteurs Ly49 par les différentes sous-populations de lymphocytes T et de cellules NK.....	53
<b>Figure 4:</b>	Expression des récepteurs Ly49 par les cellules NK et les lymphocytes T DN spléniques de la souris C57BL/6.....	67
<b>Figure 5:</b>	Expression des récepteurs Ly49 par différentes populations spléniques de lymphocytes exprimant le récepteur NK1.1.....	69
<b>Figure 6:</b>	Modulation de la fréquence relative des cellules NK et les lymphocytes T DN spléniques après une culture en présence d'IL-15.....	71
<b>Figure 7:</b>	Modulation du niveau d'expression (MFI) des récepteurs Ly49 sur les cellules NK et les lymphocytes T DN suite à une culture en présence d'IL-15.....	72
<b>Figure 8:</b>	Analyse de spécificité de l'anticorps 3LP218.....	75
<b>Figure 9:</b>	Expression de récepteurs Ly49 dont Ly49B par les cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon après déplétion des cellules CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> .....	77
<b>Figure 10:</b>	Expression du récepteur Ly49B par les cellules spléniques non enrichies de la souris BALB/c.....	79
<b>Figure 11:</b>	Expression du récepteur Ly49B dans différents organes de la souris BALB/c.....	80
<b>Figure 12:</b>	Phénotype des cellules de la moelle osseuse de souris BALB/c exprimant le récepteur Ly49B.....	82
<b>Figure 13:</b>	Expression du récepteur Ly49B par les cellules de la cavité péritonéale après stimulation au thioglycollate 3%.....	84
<b>Figure 14:</b>	Expression du récepteur Ly49B par différentes souches de souris.....	86

<b>Figure 15:</b> Expression du récepteur Ly49B par une lignée cellulaire de macrophages et modulation de son niveau d'expression.....	88
<b>Figure 16:</b> Immunoprécipitation du récepteur Ly49B.....	90
<b>Figure 17:</b> Phosphorylation sur tyrosine du récepteur Ly49B et recrutement de la phosphatase SHP-1.....	92
<b>Figure 18:</b> Tentative d'inhibition de la production d'oxyde nitrique.....	94
<b>Figure 19:</b> Tentative d'inhibition de la phagocytose.....	96
<b>Figure 20:</b> ADCC par des cellules RAW264.7 contre les cellules EL4.....	98
<b>Tableau 1:</b> Liste et caractéristiques des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux.....	51

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å:	angström
$\alpha$ -GalCer:	$\alpha$ -galactosylcéramide
ADCC:	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
ARNm:	acide ribonucléique messager
ATCC:	American type culture collection
$\beta_2$ m:	$\beta_2$ -microglobuline
$\beta$ -2ME:	$\beta$ -2-mercaptoethanol
BCR:	récepteur des cellules B
BSA:	albumine sérique bovine
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
CRD:	"carbohydrate-recognition domain"
°C:	degré Celcius
DMEMc:	DMEM complet
DMSO:	diméthyl sulfoxyde
DN:	double négative (CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> )
DO:	densité optique
EDTA:	acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA:	"ethyleneGlycol- $\beta$ -aminoethyl ether-tetraacetic acid"
ELISA:	"enzyme-linked immunosorbent assay"
Fc:	fragment constant
FcR $\gamma$ c	chaîne $\gamma$ commune des récepteurs Fc
Flt-3L:	"Fms-like tyrosine kinase ligand"
FITC:	isothiocyanate de fluorescéine
G-CSF	"granulocyte colony stimulating factor"
GM-CSF:	"granulocyte macrophage colony stimulating factor"
h:	heure
HBSS:	"Hank's balanced salt solution"
HEPES:	acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonique
HRP:	"horseradish peroxydase"
Ig:	immunoglobuline
IFN:	interféron
IL:	interleukine
ILT:	"Ig-like transcripts"
ITAM:	"immunoreceptor tyrosine-based activation motif"
ITIM:	"immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif"
JA:	cellules Jurkat transfectée avec l'ADNc de Ly49A
JB:	cellules Jurkat transfectée avec l'ADNc de Ly49B
JC:	cellules Jurkat transfectée avec l'ADNc de Ly49C
JWT:	cellules Jurkat de type sauvage
kb:	kilobase
kDa:	kilo Dalton

KIR:	"killer immunoglobulin-like receptors"
LCMV:	"lymphocytic choriomeningitis virus"
Lin <sup>-</sup> :	cellule n'exprimant pas de marqueur de lignée cellulaire (ex. CD3, CD19...)
LINE-1:	séquences répétitives de la famille L-1
LIR:	"leucocyte Ig-like receptors"
LPS:	lipopolysaccharide
MCMV:	cytomégalovirus murin
M-CSF:	"macrophage colony stimulating factor"
min:	minute
mg:	milligramme
MIP:	"macrophage inflammatory protein"
MIR:	"monocytes-macrophages Ig-like receptors"
ml:	millilitre
mM:	millimolaire
ng:	nanogramme
NHS-biotine:	Sulfo-N-Hydroxysuccinimidobiotine
NK:	Natural Killer
NKC:	complexe des gènes NK
NO:	oxyde nitrique
NOD:	diabétique non obèse
NP-40:	Nonidet P-40
PBS:	tampon phosphate salin
PCR:	réaction de polymérisation en chaine
PE:	phycoérythrine
PGS:	protéine G Sepharose™ 4 Fast Flow
PIR:	"paired immunoglobulin-like receptor"
PMSF:	fluorure de phénylméthylsulfonyl
poly I:C:	acide polyinosinique-polycytidylique
PU.1:	"Purine rich box-1"
RANTES:	"regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted"
RPMIc:	RPMI complet
RT-PCR:	PCR-transcriptase inverse
SA:	streptavidine
SCF:	"stem cell factor"
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SVF:	sérum de veau fœtal
TAP:	transporteur associé au traitement de l'antigène
TBS:	tampon tris salin
TCF-1:	"T cell factor-1"
TCR:	récepteur des cellules T
TGF:	"tumor growth factor"
TNF:	"tumor necrosis factor"
U/ml:	unité par millilitre
μg:	microgramme
μl:	microlitre

## I. INTRODUCTION

Avec l'évolution, les mammifères ont développé un système de défense contre les agressions par les pathogènes présents dans leur environnement. Les différentes cellules du système immunitaire jouent un rôle primordial dans la défense de l'organisme. Les pathogènes devenant de plus en plus dangereux, les cellules immunitaires ont dû évoluer elles aussi, pour devenir de plus en plus efficaces pour contrer les attaques. Nos cellules de défense sont maintenant si puissantes que leur suractivation peut être lourde de conséquences en provoquant notamment des maladies autoimmunes. Heureusement, divers systèmes de contrôle de l'activation de ces cellules se sont aussi développés. Un de ces moyens est l'expression de récepteurs inhibiteurs par les différentes cellules du système immunitaire.

L'étude des récepteurs inhibiteurs qui contrôlent l'activité fonctionnelle des cellules NK a constitué l'élément initiateur de l'analyse de ces mécanismes régulateurs que l'on sait aujourd'hui, opérer dans la plupart des cellules immunitaires. Chez la souris, la famille des récepteurs Ly49 joue un rôle important dans la régulation de l'activité fonctionnelle des cellules NK. La majorité des récepteurs Ly49 ont un potentiel inhibiteur. Lorsqu'ils sont engagés avec leurs ligands, des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité, les récepteurs Ly49 inhibiteurs peuvent contrer les signaux d'activation cellulaire engendrés par d'autres récepteurs activateurs. Bien que les récepteurs Ly49 soient surtout associés aux cellules NK, des récepteurs Ly49 inhibiteurs sont aussi exprimés par certaines sous-populations de cellules T mémoires et de cellules NKT.

À ce jour, plus d'une vingtaine de récepteurs Ly49 ont été identifiés. La grande homologie entre les différents membres de la famille Ly49 est un facteur limitant la progression des connaissances à leur sujet. En effet, la comparaison des séquences d'acides nucléiques des gènes *Ly49* a révélé une homologie de l'ordre de 70 à 97%. Le développement d'un anticorps monoclonal spécifique à un seul récepteur Ly49 est un outil précieux pour en déterminer les propriétés. Cependant, la similitude entre les

récepteurs Ly49 fait que plusieurs des anticorps monoclonaux disponibles réagissent avec plus d'un récepteur, ce qui limite leur utilisation. Notre laboratoire a néanmoins produit deux anticorps monoclonaux qui sont spécifiques à un seul récepteur Ly49, soit l'anticorps 4LO3311 qui reconnaît Ly49C et 4LO439 spécifique au récepteur Ly49G2 de la souris C57BL/6 (Lemieux *et al.*, 1991; Gosselin *et al.*, 1997; Depatie *et al.*, 1999). D'ailleurs, 4LO3311 est présentement le seul anticorps disponible reconnaissant seulement le récepteur Ly49C. Un autre anticorps monoclonal, le 5GA5 a aussi été produit dans notre laboratoire, celui-ci reconnaît un épitope commun aux récepteurs Ly49C et Ly49I (Ly49C/I) (Depatie *et al.*, 1999). Ces trois anticorps se sont avérés très utiles pour la réalisation des travaux présentés dans ce mémoire.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la capacité d'un récepteur à inhiber l'activation cellulaire notamment, l'intensité de l'expression de ce récepteur. Si celui-ci est fortement exprimé, les probabilités de rencontre avec son ligand sont plus élevées, donc meilleures sont les chances d'enclencher un signal d'inhibition. Dans le premier volet de ce projet de maîtrise nous avons comparé l'expression de certains récepteurs Ly49 inhibiteurs par différentes populations cellulaires. Sachant que l'expression des récepteurs Ly49 peut être modulée et que cette modulation peut faire varier leur efficacité à initier un signal inhibiteur, nous avons par la suite évalué l'effet de cytokines sur l'expression de ces récepteurs.

Dans le second volet des travaux présentés dans ce mémoire, nous avons amorcé la caractérisation d'un récepteur Ly49 bien particulier, soit Ly49B. Nos connaissances à son sujet étaient jusqu'à maintenant très limitées, notamment à cause de l'absence d'un anticorps monoclonal spécifique à ce récepteur. La réussite à produire un tel réactif dans notre laboratoire nous a donc permis de progresser dans la caractérisation de ce récepteur qui se distingue des autres membres de la famille Ly49 à plusieurs égards.

## II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Les récepteurs Ly49

#### 1.1. Caractéristiques générales

Les récepteurs Ly49 forment une famille de glycoprotéines transmembranaires de type II (extrémité amino-terminale intracellulaire) codées par des gènes localisés sur le chromosome 6 de la souris dans une région nommée le "complexe des gènes NK" (NKC) (Brown *et al.*, 1997). Ces molécules sont exprimées sous forme d'homodimères liés par des ponts disulfures, chaque sous-unité ayant une masse moléculaire d'environ 40 à 60 kDa selon le récepteur Ly49. Ces protéines sont apparentées aux lectines de type C bien qu'il a été démontré que la présence de  $Ca^{2+}$  n'est pas essentielle pour la liaison à leurs ligands (Weis, Taylor et Drickamer, 1998). Ces récepteurs, découverts sur une sous-population de lymphocytes T vers la fin des années 80 (Nagasawa *et al.*, 1987; Chan et Takei, 1988; Yokoyama *et al.*, 1989), représentent la plus grande famille de récepteurs impliqués dans la régulation de l'activité fonctionnelle des cellules "Natural Killer" (NK) chez la souris. Des récepteurs Ly49 ont aussi été retrouvés chez d'autres espèces dont le rat, le babouin et la vache (Dissen *et al.*, 1996; Mager *et al.*, 2001; McQueen *et al.*, 2002). Par contre, il semble que l'expression de cette famille de protéine se soit perdue avec l'évolution puisque chez l'humain un seul gène *Ly49* a été trouvé (Ly49L) (Westgaard *et al.*, 1998). Celui-ci est plutôt considéré comme un pseudogène car il code pour une protéine tronquée et par conséquent non fonctionnelle. Chez l'humain, les "killer immunoglobulin-like receptors" (KIR) jouent un rôle équivalent à celui des récepteurs Ly49; leur structure est toutefois très différente.

#### 1.2. Le complexe des gènes NK

À ce jour, 23 membres de la famille ont été découverts (Ly49A à Ly49W) mais ils ne sont pas tous exprimés par toutes les souches de souris. Par exemple, la souche de souris la plus étudiée, C57BL/6, exprime 11 récepteurs potentiellement fonctionnels (Ly49A-J et Q) et cinq pseudogènes (Ly49K-N et V) (Anderson, Ortaldo et McVicar,

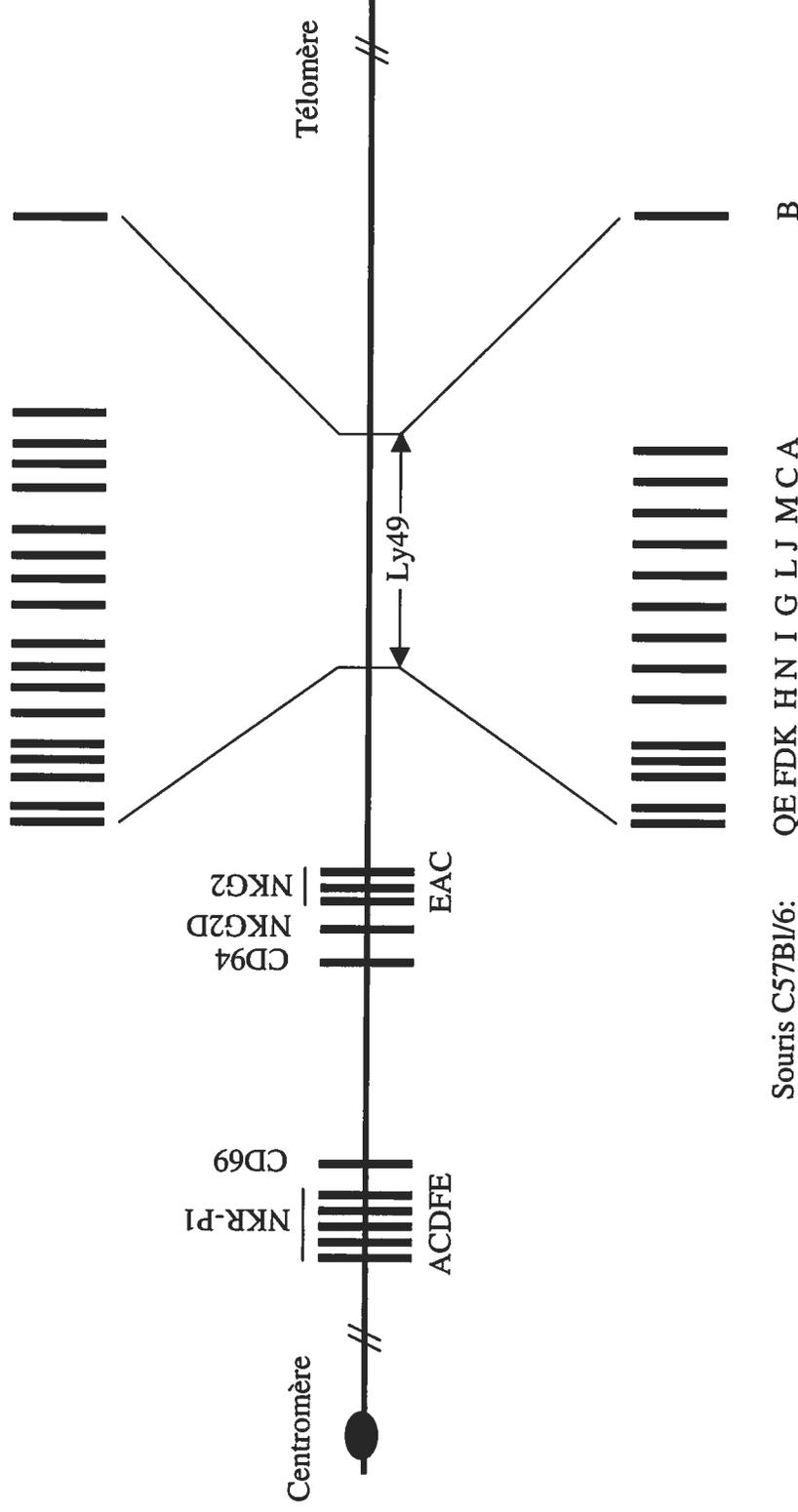
2001). Les gènes *Ly49* sont groupés dans la portion la plus télomérique du NKC, plus précisément dans une région dont la taille varie de 420 à 600 kb selon la souche. La seule exception est *Ly49b* qui, chez la souris C57BL/6, se retrouve à environ 750 kb du côté télomérique de *Ly49a*, le plus distal des gènes de la région *Ly49* (Takei *et al.*, 1997). Il est important de noter que l'organisation des gènes dans le NKC varie beaucoup selon la souche de souris étudiée (Brown *et al.*, 2001a). Les gènes *Ly49* ne font pas exception à cette règle. Par exemple, la comparaison des NKC des souches C57BL/6 et 129 illustre bien la diversité présente dans la région des gènes *Ly49* (Figure 1). Non seulement les gènes *Ly49* présents dans les NKC de ces deux souches ne sont pas tous les mêmes mais leur ordre et leur nombre varient également. D'autres récepteurs associés aux cellules NK sont aussi codés dans le NKC. Les principaux sont ceux de la famille NKR-P1, les gènes CD69 et NKG2D et ceux des récepteurs CD94/NKG2 (Plougastel *et al.*, 2001; Takei *et al.*, 2001; Makrigiannis *et al.*, 2002).

### **1.3. Structure et fonctions des récepteurs Ly49**

#### **1.3.1. Homologies et diversité des récepteurs Ly49**

Il existe une très forte homologie entre les différents membres de la famille des récepteurs *Ly49*. Ainsi, chez la souris C57BL/6, l'homologie des séquences nucléotidiques des régions codantes des différents gènes *Ly49* varie de 69,8 à 96,9% (Makrigiannis et Anderson, 2000). La comparaison des séquences déduites en acides aminés a permis d'identifier trois groupes (Held *et al.*, 1999a; Kane, Silver et Hazes, 2001; Takei *et al.*, 2001). Les récepteurs apparentés à *Ly49A* comprennent *Ly49D*, G, L, M, O, P, Q, R, T, V et W (en incluant ceux qui sont des pseudogènes chez certaines souches). Le deuxième groupe est défini sur la base de son homologie avec le récepteur *Ly49C*; il comprend les récepteurs *Ly49E*, F, H, I, J, K, N, S et U. Le troisième groupe est composé à ce jour d'un seul membre, soit le récepteur *Ly49B*. Le gène qui code pour ce récepteur est d'ailleurs celui qui diffère le plus des autres avec un pourcentage maximal d'homologie de l'ordre de 70% avec les autres gènes *Ly49* (Brennan *et al.*, 1994; Makrigiannis et Anderson, 2000). Le fait que les séquences des récepteurs *Ly49* soient très similaires suggère que le répertoire de leurs gènes se soit développé rapidement par

Souris 129: Q<sub>1</sub> E V Q<sub>2</sub> E/C<sub>2</sub> L/R S T E/C<sub>1</sub> R U U/I I<sub>1</sub> G P/D I<sub>2</sub> P O B



≈ 4 Mb

**Figure 1. Illustration schématique du complexe des gènes NK.**

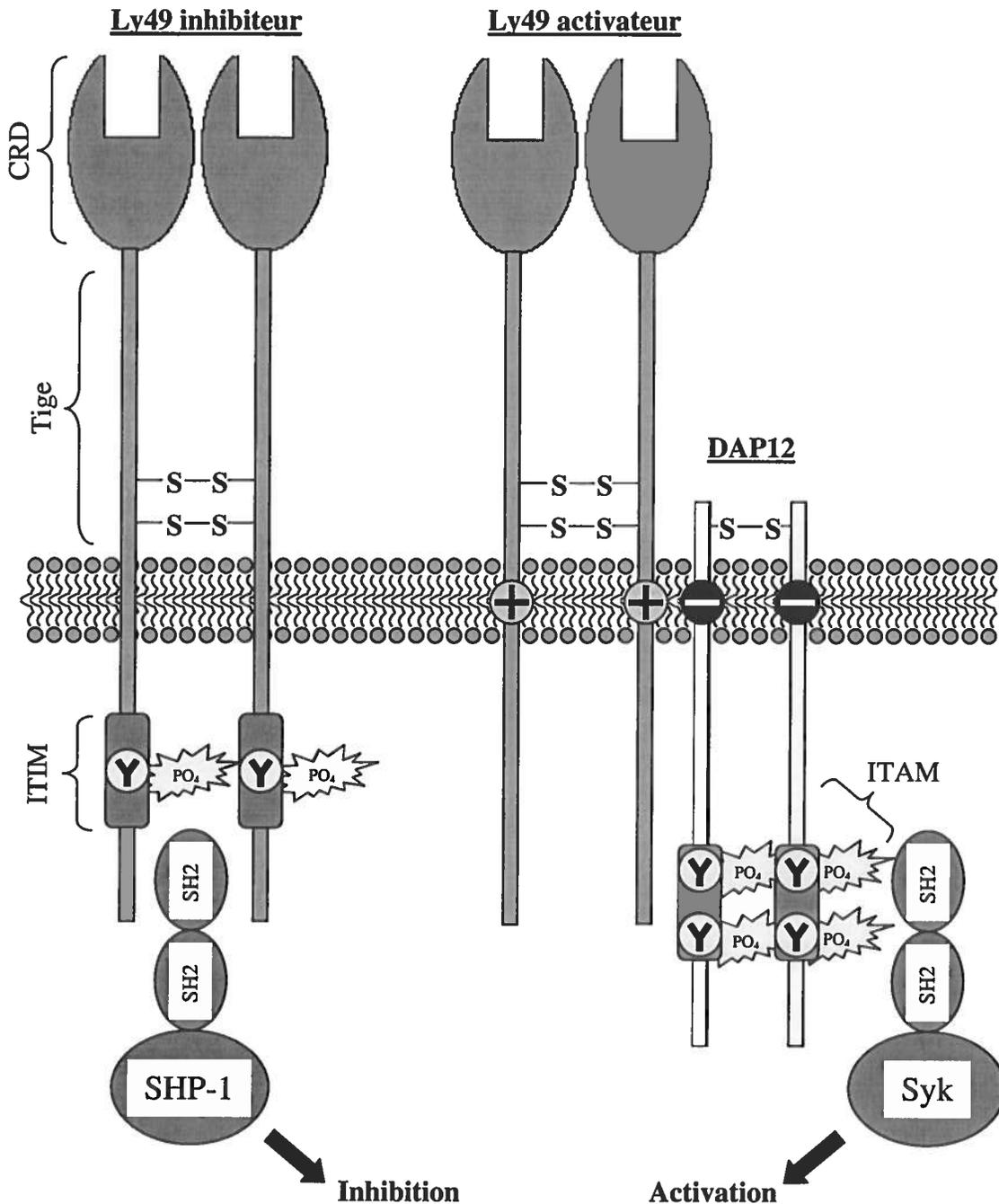
Le complexe des gènes NK (NKC) comprend plusieurs gènes associés aux cellules NK, dont ceux de la famille *Ly49* située en aval des familles *Nkr-p1* et *NKG2*, entre lesquelles se situent aussi les gènes *CD94* et *NKG2D*. *Ly49b* a une position particulière chez la souris C57BL/6. En effet, il se retrouve isolé à environ 750 pb du côté télomérique de *Ly49a*. La position de *Ly49b* pour la souris 129 est la position présumée car elle n'a pas encore été identifiée avec exactitude. (D'après Plougastel *et al.*, 2001; Takei *et al.*, 2001; Makrigiannis *et al.*, 2002).

des mécanismes de recombinaison, duplication et conversion de gènes (revu par Makrigiannis et Anderson, 2001a ainsi que par Takei *et al.*, 2001). La diversité de la famille des récepteurs Ly49 est amplifiée par le fait que certains gènes subissent de l'épissage alternatif, ce qui donne lieu à différentes isoformes d'un même récepteur. Par exemple le récepteur Ly49G peut avoir quatre formes différentes nommées G1, G2, G3 et G4 (Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994; Brennan *et al.*, 1994). Une autre source de diversité est le polymorphisme allélique. En effet, les séquences d'un gène *Ly49* peuvent varier légèrement selon la souche de souris qui l'exprime; par exemple pour *Ly49G2*, l'allèle du gène de la souris C57BL/6 a 97,6% d'homologie avec celui de la souris CBA/J et 98,0% avec celui de la souche 129/J (Makrigiannis et Anderson, 2000). Ce polymorphisme allélique rend parfois difficile l'identification de nouveaux récepteurs. En effet, si les séquences de deux gènes retrouvés chez deux souches de souris sont très homologues mais non identiques, il est parfois impossible de déterminer si ce sont deux gènes différents ou deux allèles d'un même gène.

### 1.3.2. Les récepteurs Ly49 inhibiteurs

Malgré leur très grande homologie, les récepteurs Ly49 n'ont pas tous la même fonction. En effet, certains récepteurs peuvent être activateurs alors que d'autres sont inhibiteurs. C'est la séquence intracellulaire d'acides aminés du récepteur qui permet de déterminer sa fonction potentielle.

Sur la base de leur structure, certains récepteurs Ly49 sont présumés avoir une fonction inhibitrice (Ly49A, B, C, E, F, G, I, J, O, Q, S, T et V) alors que la séquence de certains autres laisse croire qu'ils sont activateurs (Ly49D, H, K, L, M, N, P, R, U et W). Ces deux groupes ont une structure similaire dans leur portion extracellulaire, soit la présence d'une tige et d'un domaine de liaison à des sucres (carbohydrate-recognition domain; CRD) (Figure 2). C'est la structure de leurs portions transmembranaire et intracellulaire qui les différencie et qui peut donner un indice sur leur fonction. En effet, les récepteurs Ly49 inhibiteurs possèdent dans leur portion cytoplasmique une séquence spécifique d'acides aminés nommée "immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif"



**Figure 2. Structure schématique des récepteurs Ly49 inhibiteurs et activateurs.**

Les récepteurs Ly49 sont composés de deux sous-unités identiques liées par des ponts disulfures. Leur portion extracellulaire comprend un domaine de liaison des sucres (CDR) et une tige. Le récepteur inhibiteur possède une séquence ITIM dans sa partie transmembranaire qui permet le recrutement d'une phosphatase lors du contact avec le ligand. Les récepteurs activateurs sont par ailleurs associés par opposition de charges dans la portion transmembranaire à la protéine adaptatrice DAP12 qui, grâce à sa séquence ITAM, est responsable de l'initiation du signal intracellulaire via le recrutement et l'activation d'une protéine kinase.

(ITIM). La séquence ITIM est V/IxYxxL/V dans laquelle "x" représente un acide aminé quelconque et "/" deux possibilités. Lors de l'engagement du récepteur avec son ligand, la tyrosine de l'ITIM d'un récepteur Ly49 inhibiteur sera phosphorylée, ce qui permettra le recrutement et l'activation d'une protéine phosphatase, SHP-1 ou SHP-2, et par conséquent l'inhibition de la signalisation cellulaire (Nakamura *et al.*, 1997). Pour que cela puisse se produire, l'engagement d'un récepteur Ly49 inhibiteur doit se faire à proximité d'un récepteur d'activation, lui-même engagé avec son ligand. Les protéines kinases de la famille Src recrutées et activées suite à l'engagement du récepteur d'activation seraient responsables de la phosphorylation des tyrosines présentes dans les ITIM des récepteurs Ly49 inhibiteurs (revu par Anderson, Ortaldo et McVicar, 2001). Chaque monomère de Ly49 ne possède qu'un seul ITIM, contrairement à d'autres récepteurs inhibiteurs, comme la majorité des KIR, qui en possèdent au moins deux. L'association des phosphatases SHP-1 et SHP-2 aux ITIM se faisant via les deux domaines SH2 de la phosphatase, les deux monomères du récepteur Ly49 sont donc impliqués dans sa fonction inhibitrice en fournissant chacun un ITIM. L'engagement des récepteurs Ly49 inhibiteurs empêche l'activité cytotoxique (Karlhofer, Ribaldo et Yokoyama, 1992) et la sécrétion de cytokines par les cellules NK (Ortaldo *et al.*, 1997).

### 1.3.3. Les récepteurs Ly49 activateurs

À l'opposé, les récepteurs Ly49 activateurs ne possèdent pas de séquence fonctionnelle d'acides aminés dans leur partie intracellulaire. Ils ont par ailleurs un acide aminé chargé (lysine ou arginine) dans leur portion transmembranaire. Cela leur permet de se lier de façon non covalente, par opposition de charges, à la protéine adaptatrice DAP12 qui possède une séquence "immunoreceptor tyrosine-based activation motif" (ITAM) dans sa portion cytoplasmique (Mason *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). La séquence en acides aminés d'un ITAM est YxxL<sub>6-8x</sub>YxxL/I. DAP12 est une petite protéine de 12 kDa exprimée sous forme d'homodimères liés par des ponts disulfures. Chacune des sous-unités contient un ITAM dont les tyrosines vont être phosphorylées lors de l'engagement du récepteur activateur par son ligand. Les protéines kinases de la famille Src sont responsables de cette phosphorylation. Une fois phosphorylée, DAP12 recrute et

active la kinase Syk, ce qui va initier une cascade de signalisation intracellulaire. La suite des événements menant à l'activation de la cellule n'a pas encore été totalement élucidée. Néanmoins, plusieurs effets ont été démontrés dont la phosphorylation de la phospholipase C $\gamma$ , la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation des MAP kinases ainsi que la transcription de plusieurs gènes, en particulier ceux codant pour des cytokines et des chimiokines (Gosselin *et al.*, 1999; Ortaldo *et al.*, 2001).

L'existence d'équivalents activateurs à des récepteurs inhibiteurs comportant des ITIM est un phénomène présent chez plusieurs familles de récepteurs (Vély et Vivier, 1997). Dans la famille Ly49, une comparaison des séquences en acides aminés des différents membres a permis de démontrer que les récepteurs Ly49 activateurs présentent une très forte homologie dans leur portion extracellulaire et particulièrement dans le CRD avec un ou des récepteur(s) Ly49 inhibiteur(s). Ce phénomène a pour conséquence que certains anticorps monoclonaux, que l'on croyait spécifiques à un seul récepteur Ly49, reconnaissent aussi d'autres récepteurs très semblables. Par exemple, l'anticorps Cwy-3 a d'abord été considéré comme étant spécifique au récepteur d'inhibition Ly49G2. On sait maintenant que cet anticorps se lie aussi aux cellules exprimant le récepteur activateur Ly49W. Les séquences en acides aminés des CRD de ces deux récepteurs sont identiques à 97,6%, tandis que celles de la tige le sont à environ 83% (Silver *et al.*, 2001). Le récepteur Ly49M est un autre équivalent activateur du récepteur Ly49G mais il n'est toutefois pas reconnu par l'anticorps Cwy-3. D'autres paires ou groupes similaires incluent Ly49A/P, Ly49O/D et Ly49C,I,J/H,U. Certains récepteurs Ly49 inhibiteurs dont, entre autres, les récepteurs Ly49B, E, et Q n'ont par encore été associés à une contrepartie activatrice. Les connaissances actuelles ne permettent pas de savoir si ces récepteurs sont réellement uniques ou bien si leur équivalent activateur n'a tout simplement pas encore été découvert (Kane, Silver et Hazes, 2001). Soulignons que ces regroupements de récepteurs sur la base de leur homologie structurale sont peut-être sans conséquence fonctionnelle. En effet, aucune observation ne permet de prouver qu'un récepteur Ly49 inhibiteur bloque préférentiellement les effets de son homologue activateur.

### 1.3.4. Les ligands des récepteurs Ly49

La presque totalité des ligands connus des récepteurs Ly49 inhibiteurs sont des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH-I). Le premier récepteur dont un des ligands a été identifié est Ly49A. Karlhofer, Ribaldo et Yokoyama (1992) ont observé que des cellules NK Ly49A<sup>+</sup> étaient incapables de lyser des cellules cibles de l'haplotype H2<sup>d</sup>. Ils ont alors émis l'hypothèse que les molécules du CMH-I de cet haplotype pourraient être responsables de la protection des cellules cibles contre les cellules NK. La transfection de l'ADN complémentaire (ADNc) de la molécule H-2D<sup>d</sup>, mais pas celle de l'ADNc de H-2K<sup>d</sup> ou H-2L<sup>d</sup> dans une cellule normalement sensible (H-2<sup>b</sup>), a rendu celle-ci résistante à la lyse par les cellules NK Ly49A<sup>+</sup>. Par contre, ces cellules redevenaient sensibles à la lyse en présence d'anticorps dirigés contre le récepteur Ly49A ou contre le CMH-I H-2D<sup>d</sup>. Ce fût la première démonstration que le récepteur Ly49A reconnaît la molécule H-2D<sup>d</sup> du CMH-I. Depuis, par des essais d'adhésion cellules-cellules et d'adhésion de cellules à des molécules de CMH-I isolées ainsi que par marquage avec des tétramères de CMH-I, il a été démontré que le récepteur Ly49A reconnaît aussi des molécules H-2D d'haplotypes différents soit H-2D<sup>k</sup> et H-2D<sup>p</sup> (Kane, 1994; Olsson-Alheim *et al.*, 1999). Par contre, il faut noter qu'il y a parfois des contradictions entre les résultats obtenus par différentes méthodes. Par exemple, Brennan et collaborateurs n'ont pas observé de liaison entre des cellules Ly49A<sup>+</sup> et des cellules cibles H-2<sup>b</sup>, tandis qu'un autre groupe a noté que des tétramères de la molécule H-2D<sup>b</sup> marquent les cellules Ly49A<sup>+</sup> (Brennan *et al.*, 1996a; Michaëlsson *et al.*, 2000). De plus, la réactivité d'un récepteur Ly49 avec un ligand donné, peut varier selon l'allèle. Ainsi, Mehta et collaborateurs (2001) ont démontré que des cellules NK Ly49A<sup>+</sup> de différentes souches de souris montrent différents degrés d'inhibition de lyse de cellules cibles H-2D<sup>d</sup>. Certains récepteurs Ly49 reconnaissent plusieurs molécules du CMH-I (ex. Ly49C) tandis que d'autres ont une spécificité plus restreinte (ex. Ly49G2). On note toutefois une certaine redondance dans la spécificité des récepteurs Ly49, plusieurs récepteurs différents pouvant se lier à un même ligand. Mentionnons enfin que plusieurs récepteurs n'ont pas encore de spécificité connue; c'est notamment le cas des récepteurs Ly49B, E, F, J, M, Q, S, T et U (revu par Anderson, Ortaldo et McVicar 2001).

Au sein de la famille Ly49, l'interaction entre Ly49A et son ligand H-2D<sup>d</sup> est celle qui a été la plus étudiée. Selon Orihuela et collaborateurs (1996), Ly49A reconnaît le CMH-I H-2D<sup>d</sup> seulement si celui-ci présente un peptide. La séquence du peptide importe peu car tous ceux qui ont été testés ont permis la liaison Ly49A/CMH-I et par conséquent l'inhibition de l'activation cellulaire via le récepteur Ly49A. En confirmation de ces résultats, le groupe d'Orihuela a aussi observé que des cellules dont les CMH-I ne présentaient pas de peptides n'étaient pas résistantes à la lyse par les cellules NK Ly49A<sup>+</sup>. Les auteurs en ont conclu que le récepteur Ly49A reconnaît une conformation du CMH-I induite par la présence du peptide. Par contre, une autre étude a montré que l'inhibition initiée par le récepteur Ly49C est aussi dépendante du peptide présenté par le CMH-I mais dans le cas de ce récepteur, il semble y avoir une certaine spécificité car ce ne sont pas tous les peptides testés qui ont eu le même effet (Franksson *et al.*, 1999). Cette spécificité du récepteur Ly49C envers le peptide n'a pas été observée par Hanke et collaborateurs, mais ils en ont observé une pour Ly49I (Hanke *et al.*, 1999). Donc la spécificité envers le peptide semble varier selon le récepteur Ly49.

Une autre équipe a prouvé, par des tests de compétition, que le site de liaison du récepteur Ly49A au CMH-I est distinct du site reconnu par le "récepteur des cellules T" (TCR) (Natarajan *et al.*, 1999). Le même groupe a aussi élucidé la structure tridimensionnelle du récepteur Ly49A lié à son ligand H-2D<sup>d</sup>. Cela a permis d'identifier deux sites du CMH-I avec lesquels interagit le récepteur Ly49A. Le premier site, auquel contribuent de façon équivalente les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du CMH-I pour la liaison, est situé à l'une des extrémités du sillon peptidique de la molécule CMH-I. La surface couverte par la liaison est légèrement inférieure à  $1000 \text{ \AA}^2$ . Le second site de liaison se trouve dans une grande cavité sous le site de liaison au peptide, dans une région qui chevauche partiellement le site de liaison au CD8, incluant une partie des domaines  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et de la  $\beta_2$ -microglobuline ( $\beta_2m$ ). Dans ce cas, la surface de liaison est beaucoup plus grande. Elle est estimée à plus de  $3300 \text{ \AA}^2$  (Tormo *et al.*, 1999). Par la suite, des analyses structurales et mutationnelles ont permis de déterminer que le site II est le plus important pour la liaison fonctionnelle entre le récepteur Ly49A et H-2D<sup>d</sup> (Matsumoto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Bien que chaque sous-unité de Ly49A puisse interagir avec

le site II du CMH-I, la liaison à deux molécules du CMH-I est impossible à cause de l'encombrement stérique.

Sundbäck et collaborateurs (2002) ont pu identifier certains acides aminés du CRD impliqués dans la liaison du récepteur Ly49C avec certaines molécules du CMH-I. Leurs travaux ont permis de montrer que ces résidus sont situés dans les mêmes régions que celles déterminées pour le récepteur Ly49A, mettant ainsi en évidence la similitude entre ces deux récepteurs pour la liaison à leurs ligands respectifs. Par ailleurs, la capacité de l'anticorps 4LO3311, qui reconnaît un épitope de la tige du récepteur Ly49C, à inhiber la liaison des cellules Ly49C<sup>+</sup> à des cibles exprimant un ligand de Ly49C suggère que des régions de la tige et du CDR puissent contribuer à la liaison avec un ligand (Brennan *et al.*, 1996b).

La structure tridimensionnelle du récepteur Ly49I a récemment été élucidée (Dimasi *et al.*, 2002). En comparaison avec Ly49A, les surfaces des CRD de chaque monomère de Ly49I qui interagissent au site II de liaison au CMH-I sont plus éloignées que dans le cas du récepteur Ly49A. À partir de cette observation, les auteurs ont formulé l'hypothèse que Ly49I pourrait se lier à deux molécules de CMH-I en même temps puisqu'il y a moins d'encombrement stérique dans ce cas-ci. L'engagement bivalent de ligands par certains récepteurs Ly49 pourrait stabiliser les interactions avec les CMH-I exprimés par les cellules cibles et ainsi favoriser la transmission du signal d'inhibition ou d'activation. Bien entendu, l'hypothèse reste à confirmer, mais l'ensemble des observations concernant la structure tridimensionnelle des récepteurs Ly49 démontre à tout le moins que les interactions récepteur Ly49/CMH-I peuvent être légèrement différentes selon le récepteur impliqué.

Dans le cas des récepteurs Ly49 activateurs, les expériences ont montré que certains d'entre eux peuvent aussi reconnaître des molécules de classe I du CMH. Les ligands peuvent être les mêmes que leur équivalent inhibiteur mais ils peuvent aussi être différents. Par exemple, le récepteur d'activation Ly49W reconnaît le CMH-I H-2D<sup>k</sup> et de façon plus faible H-2D<sup>d</sup>, tandis que Ly49G, son homologue inhibiteur, reconnaît

fortement H-2D<sup>d</sup> mais pas H-2D<sup>k</sup> (Silver *et al.*, 2001). Donc, malgré la très grande homologie de leurs sites de liaison au ligand, ces deux récepteurs Ly49 ont chacun leur spécificité. D'autres récepteurs Ly49 activateurs sont aussi reconnus pour avoir des CMH-I comme ligands dont Ly49D, P et R (Silver *et al.*, 2000; Makrigianis *et al.*, 2001b). Toutefois, comme c'est le cas pour les récepteurs inhibiteurs, il est possible que la spécificité des ligands varie selon l'allèle du récepteur Ly49 activateur. D'autres études sont nécessaires pour éclaircir ce point.

Récemment, il a été démontré pour la première fois qu'un récepteur Ly49 peut avoir un ligand d'origine virale. Par des approches différentes, trois groupes sont arrivés à la conclusion que le récepteur d'activation Ly49H était impliqué dans la résistance des souris au cytomégalo virus murin (MCMV) (Lee *et al.*, 2001a; Brown *et al.*, 2001b; Daniels *et al.*, 2001). Lee et collaborateurs, ainsi que Brown et collaborateurs, ont utilisé une approche génétique, tandis que Daniels et collaborateurs ont fait des déplétions de sous-populations cellulaires. Une autre équipe a démontré que le récepteur Ly49H se lie à la protéine m157 du MCMV (Arase *et al.*, 2002). Cette glycoprotéine virale possède une structure très similaire aux molécules du CMH-I. Le groupe d'Arase a aussi testé d'autres récepteurs Ly49 (Ly49C<sup>B6</sup>, Ly49I<sup>B6</sup>, Ly49I<sup>129</sup>, Ly49U<sup>129</sup>) dont les séquences sont très apparentées à celle du récepteur Ly49H<sup>B6</sup>, pour vérifier s'ils se lient aussi à la protéine m157. Seul le récepteur d'inhibition (Ly49I) de la souris 129, mais pas celui de la souris C57BL/6, a réagi avec le ligand viral. La souris 129 n'exprime pas Ly49H. La susceptibilité de certaines souches de souris aux infections par le MCMV pourrait donc avoir deux causes: soit qu'elles n'expriment pas le récepteur d'activation Ly49H ou qu'elles expriment le récepteur d'inhibition Ly49I. Pour expliquer l'origine virale d'un ligand de récepteur Ly49, le groupe d'Arase propose que la protéine m157 aurait évolué pour conférer un avantage sélectif au MCMV en inhibant la réponse immunitaire de l'hôte. Un des récepteurs Ly49 reconnaissant la protéine virale a probablement évolué à partir de l'autre, suite aux pressions sélectives faites par le virus.

Malgré la présence d'un CRD dans la structure des récepteurs Ly49, il n'est pas tout à fait clair si la présence de sucres sur le CMH-I est nécessaire pour la liaison

Ly49/CMH-I. Premièrement, les séquences des CRD des récepteurs Ly49 ne sont pas entièrement identiques à d'autres CRD de lectines de type C. De plus, certains acides aminés très conservés dans d'autres CRD ne se retrouvent pas dans la séquence des CRD des récepteurs Ly49 (Drickamer et Taylor, 1993). Néanmoins, Ly49A et Ly49C peuvent se lier au sucre fucoïdine sulfaté (Daniels *et al.*, 1994). D'autres sucres peuvent aussi inhiber la liaison de cellules Ly49C<sup>+</sup> avec d'autres cellules H-2<sup>b</sup> (Brennan *et al.*, 1995). Toutefois, les différents sucres utilisés pour ces études *in vitro* ne sont pas des ligands naturels des CRD des récepteurs Ly49 puisqu'ils ne sont pas retrouvés dans des cellules de mammifères. Par contre, le traitement de cellules H-2D<sup>d+</sup> avec un inhibiteur de glycosylation a diminué leur liaison à des cellules Ly49A<sup>+</sup> et les a aussi rendues sensibles à la lyse par des cellules NK Ly49A<sup>+</sup> (Daniels *et al.*, 1994). À l'opposé, plusieurs études ont utilisé des tétramères de CMH-I produits par des bactéries, par conséquent non glycosylés, pour la liaison à des récepteurs Ly49. Ainsi, la présence de sucres sur les molécules de CMH-I ne serait pas essentielle pour la liaison aux récepteurs Ly49 (Hanke *et al.*, 1999; Michaëlsson *et al.*, 2000). Les résultats sont donc contradictoires et il n'est présentement pas possible de connaître avec certitude le rôle que jouent les sucres dans les liaisons récepteur Ly49/CMH-I.

### 1.3.5. L'hypothèse du "missing self"

Une cellule NK reçoit constamment des signaux d'activation via des récepteurs reconnaissant des ligands sur les cellules de son environnement. Son activation doit donc être bien contrôlée pour éviter qu'elle devienne auto-réactive. La cellule NK a la capacité de distinguer les cellules saines des cellules infectées ou tumorales via l'expression des CMH-I. En effet, une cellule saine exprimant un niveau normal de CMH-I ne sera pas détruite par une cellule NK. Par contre, une cellule dont le niveau d'expression des CMH-I est altéré, comme dans le cas d'une infection virale ou d'une transformation néoplasique, ne pourra induire l'inhibition de la cellule NK et par conséquent, sera lysée par celle-ci. Les cellules NK identifient donc l'absence de l'expression des CMH-I. L'hypothèse du "missing self" a été formulée à partir de cette observation. Elle explique pourquoi une cellule NK pourra lyser une cellule cible seulement quand celle-ci n'exprime pas

suffisamment de CMH-I (Ljunggren et Kärre, 1990). La protection de la cellule cible induite par l'expression des CMH-I est possible grâce à leur engagement avec des récepteurs inhibiteurs présents à la surface des cellules NK, dont les récepteurs Ly49.

#### 1.4. Expression des récepteurs Ly49

##### 1.4.1. Acquisition de l'expression des récepteurs Ly49

De récentes études sur l'acquisition de l'expression des récepteurs Ly49 au cours du développement des cellules NK semblent favoriser le "modèle d'expression séquentielle". Celui-ci propose qu'une cellule NK exprime les récepteurs Ly49 de façon séquentielle jusqu'à ce qu'elle en exprime suffisamment qui sont spécifiques aux CMH-I du soi pour générer un signal assez fort pour l'inhibition de l'activité cellulaire. Ce serait nécessaire pour que dans des conditions normales, chaque cellule NK soit tolérante aux cellules autologues. Une fois ce seuil atteint, l'expression de nouveaux récepteurs Ly49 serait inhibée (Raulet, Vance et McMahon, 2001). Deux équipes ont particulièrement participé à éclaircir la compréhension du processus. La première, celle de Raulet, a montré que des cellules ayant un phénotype  $NK1.1^+CD3^-Ly49^-$  pouvaient acquérir l'expression de récepteurs Ly49 suite à leur transfert *in vivo* dans une souris hôte dont les lymphocytes avaient été préalablement éliminés par irradiation (Dorfman et Raulet, 1998). Ainsi, cette équipe a observé par cytométrie en flux, que l'expression des récepteurs Ly49G2 et Ly49C/I était acquise par ces cellules mais pas celle du récepteur Ly49A. À partir de ces résultats, ils ont émis l'hypothèse que l'expression du récepteur Ly49A débiterait à un stade plus précoce dans le développement des cellules NK, soit avant l'apparition du récepteur NK1.1 (Dorfman et Raulet, 1998). Par des études *in vitro*, le même laboratoire a pu confirmer ces résultats. En effet, la culture de cellules  $NK1.1^+DX5^-Ly49^-$ , en présence de cellules stromales et de différentes cytokines, leur a permis de montrer l'apparition des récepteurs Ly49G2, C et I mais pas celle des récepteurs Ly49A et F (Roth *et al.*, 2000). Par contre, la culture de précurseurs  $c-kit^+Sca-2^-Lin^-$  a permis de vérifier l'apparition de ces deux récepteurs. Les chercheurs ont aussi noté que l'haplotype des cellules stromales a une influence sur l'apparition des différents

récepteurs Ly49. Selon les observations de cette équipe, l'ordre d'apparition des récepteurs Ly49 testés serait la suivante : Ly49A et F  $\Rightarrow$  Ly49G2  $\Rightarrow$  Ly49C/I.

Williams et collaborateurs ont aussi contribué à soutenir l'hypothèse du modèle d'expression séquentielle des récepteurs Ly49 malgré le fait que leurs résultats ne semblent pas être en parfaite corrélation avec ceux du groupe cité précédemment (Williams *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2000). Ces chercheurs ont mis en culture des précurseurs Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> en présence de cytokines et ont isolé les cellules ayant un phénotype NK1.1<sup>+</sup>IL-2/15R $\beta$ <sup>+</sup> et les ont remises en culture en présence de cellules stromales. Ils ont ensuite mesuré par RT-PCR la présence de l'ARNm de différents récepteurs Ly49. Dans ces conditions, le premier récepteur Ly49 à apparaître est Ly49B dont l'ARNm est même présent dans les cellules NK1.1<sup>+</sup>IL-2/15R $\beta$ <sup>+</sup>. Les autres récepteurs Ly49 dont l'ARNm est ensuite détecté sont Ly49G, ensuite Ly49C et I et finalement Ly49A, D, E et F.

À première vue les résultats de ces deux équipes semblent contradictoires. Les différences peuvent s'expliquer par les conditions expérimentales. Les cellules de base utilisées n'avaient pas tout à fait le même phénotype et les conditions de culture étaient légèrement différentes. L'équipe de Raulet a mesuré l'expression protéique des récepteurs Ly49 tandis que celle de Williams a mesuré la présence des ARNm de ces récepteurs. Il est possible que l'expression des récepteurs Ly49 à la surface de la cellule soit aussi modulée par des mécanismes post-transcriptionnels. À tout le moins, deux points importants sont confirmés par les résultats des deux équipes. Premièrement, l'acquisition des récepteurs Ly49 par les cellules NK en développement est dépendante des CMH-I présents sur les cellules stromales. Deuxièmement, les récepteurs Ly49 sont exprimés de façon séquentielle et cumulative, ce qui confirme le modèle présenté précédemment. L'ordre d'apparition des différents récepteurs Ly49 reste toutefois à confirmer (revu par Raulet *et al.*, 2001 ainsi que par Takei *et al.*, 2001).

## 1.4.2. Régulation de l'expression des récepteurs Ly49

### 1.4.2.1. Régulation transcriptionnelle

Les mécanismes qui régulent l'expression des gènes codant pour les récepteurs Ly49 sont encore peu caractérisés. Held et collaborateurs ont néanmoins démontré l'importance du facteur de transcription TCF-1 (T cell factor-1) dans la régulation de l'expression du récepteur Ly49A. Ils ont observé que la fréquence des cellules NK exprimant ce récepteur est réduite de façon très importante (plus de 20 fois) chez des souris déficientes pour l'expression de TCF-1 (TCF-1<sup>-/-</sup>). L'étude du promoteur de Ly49A leur a permis d'identifier deux sites de liaisons de ce facteur de transcription (nommés site I et site II) (Held *et al.*, 1999b). La même équipe a ensuite repris des recherches semblables pour d'autres récepteurs Ly49 et a observé que tout comme Ly49A, l'expression des gènes de Ly49D et Ly49I est régulée positivement par TCF-1 tandis que celle de Ly49G2 est régulée négativement par ce même facteur. TCF-1 ne semble pas avoir d'effet sur l'expression du récepteur Ly49C. En comparant les séquences des promoteurs de ces récepteurs, ils ont constaté que les deux sites de liaison de TCF-1 ne sont pas présents pour tous les récepteurs Ly49. Par exemple, Ly49A et Ly49G possèdent les deux sites, Ly49F et Ly49I n'ont que le site I, tandis que Ly49C et Ly49D n'en ont aucun. Le fait que les deux sites soient présents dans les promoteurs de Ly49A et Ly49G alors que TCF-1 a un effet opposé pour ces deux récepteurs suggère que ce facteur de transcription pourrait avoir d'autres mécanismes d'action qui restent à préciser. Une autre observation qui renforce cette hypothèse est que l'expression de Ly49D est réduite chez les souris TCF-1<sup>-/-</sup> même si son promoteur ne possède aucun des deux sites de liaison à TCF-1. Cette même équipe a démontré, par des tests de mutations, que la liaison de TCF-1 au site II a un effet activateur sur la transcription. À l'opposé, quand TCF-1 se lie au site I, il agit à titre de répresseur (Kunz et Held, 2001). Puisque TCF-1 n'affecte pas l'expression de tous les gènes des récepteurs Ly49 testés, il est fort probable qu'il y ait d'autres facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de ces gènes (Takei *et al.*, 2001).

PU.1 (Purine rich box-1) est un autre facteur de transcription qui semble jouer un rôle sur l'expression de certains récepteurs Ly49 par les cellules NK. PU.1 est un membre de la famille de facteurs de transcription Ets (E26 transformation specific). Chez des cellules NK déficientes pour son expression (PU.1<sup>-/-</sup>), les récepteurs Ly49A, Ly49D et Ly49G2 sont exprimés par une moins grande proportion de cellules comparativement aux cellules NK normales. La diminution de l'expression est particulièrement marquée pour les récepteurs Ly49A et Ly49D qui sont presque totalement absents chez les cellules NK PU.1<sup>-/-</sup>. À l'opposé, l'expression des récepteurs Ly49C/I n'est pas affectée par l'absence de PU.1. De plus l'activité de PU.1 semble être indépendante de celle de TCF-1 car ce dernier facteur est présent à un niveau normal dans les cellules NK PU.1<sup>-/-</sup> (Colucci *et al.*, 2001).

La comparaison des séquences des régions des promoteurs des gènes de neuf récepteurs Ly49, ainsi que les sites d'initiation de transcription, montre que malgré une grande homologie dans les séquences des promoteurs des différents récepteurs Ly49, les sites d'initiation de la transcription sont très variables selon les récepteurs Ly49. De plus, la présence d'une boîte TATA ne semble pas essentielle pour leur expression (Wilhelm *et al.*, 2001). Cela semble contredire en partie les résultats des travaux d'une autre équipe qui montraient une certaine importance de la boîte TATA à tout le moins pour l'expression du gène *Ly49i* (Gosselin *et al.*, 2000). Il est clair que les résultats obtenus par l'étude d'un seul récepteur Ly49 ne peuvent pas toujours être généralisés pour l'ensemble de la famille. La grande homologie des séquences des promoteurs des récepteurs étudiés par Wilhelm et collaborateurs, qui sont pourtant exprimés à des niveaux différents, laisse supposer que d'autres régions de ces gènes auraient une influence sur leur expression. Les gènes *Ly49b* et *Ly49h* diffèrent des autres gènes par la présence de longues séquences répétées dans la région de leur promoteur (Wilhelm *et al.*, 2001). Ce point sera traité plus en détails à la section 1.5.

Récemment, un nouveau promoteur des gènes Ly49 a été découvert (Pro-1) (Saleh *et al.*, 2002). L'activité de Pro-1 a été détectée dans la moelle osseuse, le thymus embryonnaire et dans les cellules NK isolées du foie. Par contre, il ne serait pas actif dans

le thymus, dans les cellules NK spléniques et les cellules NKT sur lesquelles nous reviendrons plus loin. Ce promoteur serait activé de façon transitoire dans les populations cellulaires qui initient l'expression des gènes des récepteurs Ly49 comme Ly49E qui est détecté chez les thymocytes fœtaux. Le fait que ce nouveau promoteur soit actif dans des organes précis, et seulement pour certaines populations cellulaires, expose bien la complexité de la régulation de la transcription des gènes des récepteurs Ly49.

#### 1.4.2.2. Facteurs génétiques, âge et influence des CMH-I

Des facteurs génétiques influencent aussi l'expression des récepteurs Ly49. En comparant les récepteurs Ly49 exprimés chez différentes souches de souris, il est clair que chacune n'exprime pas tous les récepteurs Ly49 identifiés à ce jour. Par exemple, la souris C57BL/6 exprime les récepteurs Ly49A à J ainsi que Ly49Q. De ce groupe, la souris 129 n'exprime que Ly49E et Ly49G. Par contre, plusieurs autres récepteurs sont présents chez cette souche dont Ly49O et Ly49P ainsi que Ly49R à V (Makrigiannis *et al.*, 2001b; Makrigiannis *et al.*, 2002).

L'expression des récepteurs Ly49 varie selon l'âge de la souris. En effet, des études ont montré que le premier récepteur Ly49 à être exprimé par les cellules NK fœtales est le récepteur Ly49E. Cela a d'abord été mis en évidence par la détection de l'ARNm de *Ly49e* (Toomey *et al.*, 1998) et ensuite par cytométrie en flux (Van Beneden *et al.*, 2001). Toutefois, l'expression de Ly49E diminue considérablement dès la naissance de la souris. À l'opposé, les autres récepteurs de la famille ne sont pas retrouvés dans les cellules fœtales et le sont aussi très peu lors des premiers jours de la souris. La proportion des cellules exprimant un ou des récepteurs Ly49 va augmenter graduellement pour atteindre un plateau lorsque la souris aura atteint l'âge de 6 à 8 semaines (Dorfman et Raulet, 1998).

En étudiant l'expression du récepteur Ly49A chez des souris congéniques H-2 sur fond B10, Karlhofer et collaborateurs (1994) ont noté que la population Ly49A<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> était difficilement détectable chez les souris exprimant l'haplotype H-2 reconnu par ce

récepteur. Plusieurs équipes sont arrivées à la même conclusion en comparant l'expression de Ly49A chez la souche C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) et la souris D8 transgénique pour H-2D<sup>d</sup> (H-2<sup>b</sup>, D<sup>b</sup>) (Olsson, Kärre et Sentman, 1995; Salcedo *et al.*, 1997). Leur système de détection étant vraisemblablement plus sensible, Olsson, Kärre et Sentman (1995) ont démontré qu'en fait le niveau d'expression de Ly49A était simplement réduit en présence de son ligand. Cette observation a conduit à l'élaboration du modèle de la calibration des récepteurs d'inhibition qui postule que les cellules NK ajustent en quelque sorte le niveau d'expression de leurs récepteurs d'inhibition en fonction du niveau d'expression de ligands présents sur les cellules environnantes de façon à ce qu'elles ne reçoivent plus de signaux d'inhibition si l'expression des CMH-I du soi est réduite ou altérée (Sentman, Olsson et Kärre, 1995). La même équipe a ultérieurement démontré que l'absence du signal d'inhibition dans des cellules NK exprimant un faible niveau de Ly49A en contact avec des cellules cibles n'exprimant que faiblement H-2D<sup>d</sup> est corrigée si l'expression du ligand est augmentée lorsque les cellules cibles sont cultivées en présence d'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Olsson-Alheim *et al.*, 1997). Le modèle de calibration des récepteurs d'inhibition se confirme également quand on compare le niveau d'expression du récepteur Ly49A chez des souris du fond C57BL/6 déficientes en  $\beta_2m$ , TAP ou  $\beta_2m.TAP$  au niveau observé chez les souris sauvages (Salcedo, *et al.*, 1997). Par des expériences de transfert adoptif on a établi que la calibration à la baisse des récepteurs d'inhibition en présence de ligands sur les cellules environnantes peut être vu comme un mécanisme d'adaptation qui s'effectue même sur des cellules NK matures (Kåse *et al.*, 1998). Le modèle de la calibration des récepteurs inhibiteurs se vérifie également pour Ly49C pour lequel on observe un niveau d'expression inversement proportionnel au niveau d'expression des molécules de CMH-I chez des souris mutantes sur un fond C57BL/6 ( $\beta_2m^{-/-}$ , TAP<sup>-/-</sup> et  $\beta_2m/TAP^{-/-}$ ) (Salcedo *et al.*, 1998). Ly49C est un récepteur qui se lie à plusieurs ligands avec des affinités différentes. En utilisant des souris congéniques sur fond C57BL/10 et BALB/c, il a été observé que la calibration à la baisse des récepteurs d'inhibition est plus prononcée en présence de ligands de forte affinité (Gosselin *et al.*, 1997). Toutefois, d'autres facteurs génétiques sont vraisemblablement en cause puisque le niveau d'expression de Ly49C sur des cellules NK de la souris B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) demeure

nettement plus faible que celui qui est détecté chez la souche BALB/c qui exprime pourtant le même haplotype.

Une même cellule peut exprimer plus d'un récepteur Ly49. Dans une étude du groupe de Takei, une analyse faite sur 80 cellules NK individuelles a permis d'identifier 66 combinaisons différentes d'expression des récepteurs Ly49 et NKG2 pour un nombre maximal de cinq récepteurs Ly49 pour une même cellule (Takei *et al.*, 2001). Il faut donc voir les cellules NK comme une population hétérogène de cellules ayant différents phénotypes et dont la capacité de liaison aux cellules avec lesquelles elles entrent en contact peut différer passablement. De plus, une analyse des cellules NK de souris transgéniques pour l'expression des récepteurs Ly49A et Ly49G2 a montré que ces deux récepteurs ont un effet additif lorsqu'ils sont engagés par leur ligand H-2D<sup>d</sup>. En effet, l'inhibition de cytotoxicité des cellules NK est plus importante lorsqu'elles expriment ces deux récepteurs plutôt qu'un seul (Hanke et Raulet, 2001). Par ailleurs, Raulet et ses collaborateurs ont démontré que la coexpression des différents récepteurs Ly49 inhibiteurs se fait de façon aléatoire et indépendante. Il est en effet possible de calculer la fréquence de cellules coexprimant des récepteurs Ly49 en multipliant les fréquences individuelles de chaque récepteur. Les auteurs ont nommé ce calcul la "règle des produits" (product rule; Raulet *et al.*, 1997). Par exemple, si le récepteur Ly49A est exprimé par 50% des cellules et que Ly49C l'est par 10%, environ 5% des cellules devraient coexprimer ces deux récepteurs ( $50\% \times 10\% = 5\%$ ). L'hypothèse se vérifie dans le cas des récepteurs Ly49 inhibiteurs. Par contre, quand une cellule exprime un récepteur Ly49 dont le ligand est présent chez cette souris, les chances que cette cellule coexprime un deuxième récepteur sont plus faibles. Il semblerait donc que l'expression des récepteurs Ly49 n'est pas seulement due au hasard, mais qu'elle soit aussi régulée par d'autres facteurs dont les interactions avec les CMH-I de l'hôte (Held et Raulet, 1997; Fahlén, Lendhal et Sentman, 2001). Une autre situation où la règle des produits ne peut s'appliquer concerne les récepteurs Ly49 activateurs. En effet, il a été démontré que le récepteur d'activation Ly49D est exprimé de façon beaucoup plus importante sur des cellules coexprimant un ou des récepteurs Ly49 inhibiteurs (Ly49A et Ly49G2) reconnaissant le même ligand (H-2D<sup>d</sup>) (Ortaldo, Winkler-Pickett et Wiegand, 2000). Il est

possible que la coexpression spécifique de récepteurs Ly49 activateurs et inhibiteurs soit déterminée lors d'un processus de sélection au cours du développement ou par une régulation coordonnée des promoteurs des gènes codant pour ces récepteurs (revu par Kane, Silver et Hazes, 2001). Dans une deuxième étude soulignant que les récepteurs Ly49 activateurs ne se conforment pas à la règle des produits, d'autres chercheurs ont montré que le récepteur activateur Ly49H est préférentiellement coexprimé avec le récepteur Ly49D. De plus, l'expression de ces deux récepteurs activateurs apparaîtrait plus tard au cours du développement que celle des récepteurs Ly49 inhibiteurs (Smith *et al.*, 2000).

### 1.5. Le récepteur Ly49B

Le récepteur Ly49B est un des premiers membres de la famille Ly49 à avoir été découverts (Wong *et al.*, 1991). L'absence d'anticorps monoclonal reconnaissant cette protéine a constitué un obstacle majeur à sa caractérisation. Cependant, les informations disponibles à propos du récepteur Ly49B sont suffisantes pour nous convaincre qu'il est passablement différent des autres membres de sa famille.

Rappelons d'abord que la position de son gène dans le NKC est très particulière. Tel que mentionné précédemment, tous les gènes connus des récepteurs Ly49, à l'exception de Ly49B, sont regroupés dans un segment d'environ 420 à 600 kb, tandis que le gène *Ly49b* se retrouve isolé à une distance d'environ 750 kb du côté télomérique du chromosome 6. Une étude récente a montré que le gène *Ly49b* ne diffère pas seulement par sa position mais aussi par les séquences nucléotidiques présentes dans la région de son promoteur. Wilhelm et collaborateurs (2001) ont en effet observé la présence de séquences répétitives de la famille L-1 (LINE-1) qui n'a été détectée que pour un seul autre récepteur Ly49, soit Ly49H. Ces deux récepteurs n'ont que 67,9% d'homologie en nucléotides dans leurs séquences codantes, mais 78% dans la région de leur promoteur et 85% dans la région où sont retrouvées les séquences LINE-1. Cela semble indiquer qu'il y aurait eu recombinaison entre les deux gènes, ce qui aurait transféré les séquences LINE-1 d'un gène à l'autre. Une autre hypothèse qui peut découler de cette étude est que

l'expression du gène *Ly49b* est possiblement régulée différemment de celle de la majorité des autres récepteurs Ly49 puisque la séquence de son promoteur diffère de celle des autres membres de la famille.

Comme il a été souligné précédemment, l'analyse des séquences nucléotidiques codantes de différents récepteurs Ly49 a démontré que c'est *Ly49b* qui diffère le plus avec un pourcentage d'homologie d'environ 70% avec les autres gènes *Ly49* alors que les récepteurs codés par ceux-ci peuvent avoir plus de 96% d'homologie entre eux (*Ly49c*, *Ly49i* et *Ly49j*) (Brennan *et al.*, 1996b; Makrigiannis et Anderson, 2000). L'analyse de la séquence prédite en acides aminés indique que la protéine Ly49B se compose de 288 acides aminés, dont 44 dans la portion cytoplasmique, 22 dans la portion transmembranaire et 222 dans la partie extracellulaire comprenant la tige et le CRD (Wong *et al.*, 1991). Le domaine cytoplasmique comprend une séquence ITIM, ce qui laisse supposer que ce récepteur aurait une fonction inhibitrice. Les séquences de ce domaine ainsi que de la portion transmembranaire varient très peu de celles des autres récepteurs Ly49. En effet, la grande majorité des acides aminés qui sont consensus pour les groupes apparentés à Ly49A et Ly49C sont aussi présents dans la séquence de Ly49B. En fait, seulement 7 acides aminés sur un total de 66 sont uniques à Ly49B dans ces deux sections. On peut donc présumer que ce récepteur n'est pas différent des autres membres de sa famille pour la signalisation intracellulaire suite à la liaison à son ligand. Par contre, le récepteur Ly49B se distingue sensiblement des autres dans son domaine extracellulaire. Sur les 222 acides aminés constituant la tige et le CRD, 97 sont uniques (à leurs positions) au récepteur Ly49B, incluant 10 séquences de 3 acides aminés ou plus. Une caractéristique unique à ce récepteur est que son CRD contient un prolongement de 20 acides aminés qui ne se retrouve chez aucun autre récepteur de la famille. Le récepteur Ly49B possède aussi deux sites potentiels de N-glycosylation (NxT/S où x = non P, non D) en position 105 et 177.

À ce jour, les séquences de trois allèles du gène de Ly49B ont été identifiées (séquences disponibles dans la base de données du NCBI). Les souris BALB/c et CBA ont un allèle identique dont la protéine codée diffère dans le CRD d'environ une dizaine

d'acides aminés de celle produite à partir des allèles des souris C57BL/6 et 129. Les récepteurs Ly49B produits par ces deux dernières souches ne diffèrent l'un de l'autre que par un seul acide aminé situé dans la partie proximale du CRD. Selon une étude génétique ayant utilisé la détection de séquences polymorphiques d'ADN monocaténaire (SSCP) dans la région du promoteur de *Ly49b* (*Ly49b-Trailer*), le gène présent chez la souche SM/J serait apparenté à ceux des souris C57BL/6 et 129 alors que celui présent chez les souris C3H/HeJ, DW/J, A/J, DBA/1J, DBA/2J, LP/J et AKR/J serait du même type que celui trouvé chez BALB/c et CBA (Lee *et al.*, 2001b). Par contre, il n'a pas été établi si ces allèles étaient transcrits et exprimés dans les différentes souches. Aucune séquence associée à *Ly49b* n'a été détectée chez les souches SJL/J et NZB/BINJ.

Quelques équipes ont réussi à transférer l'ADNc du récepteur Ly49B dans les lignées cellulaires COS-7 (Hanke *et al.*, 1999 ; Corral *et al.*, 1999), C1498 (Smith *et al.*, 2000) et Jurkat J77.6 (Lévesque, 2001). Aucun anticorps anti-Ly49B n'étant disponible, l'expression de la protéine a été vérifiée par la détection d'une étiquette fusionnée avec la protéine Ly49B ou encore par immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps polyclonaux reconnaissant un épitope de la portion cytoplasmique commun à plusieurs récepteurs Ly49. Ces cellules transfectées Ly49B<sup>+</sup> ont été utilisées dans des analyses de spécificité ou de production d'anticorps (Corral *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000; Lévesque, 2001) et pour rechercher le ou les ligands (Hanke *et al.*, 1999). Ces derniers travaux ont d'ailleurs échoué, malgré le fait que les cellules transfectées Ly49B<sup>+</sup> ont été testées pour leur réactivité avec des CMH-I de plusieurs haplotypes. Le ligand de Ly49B demeure donc inconnu. Le fait que la séquence du CRD du récepteur Ly49B soit si différente de celle des autres membres de la famille et que les cellules Ly49B<sup>+</sup> ne réagissent avec aucun des CMH-I testés laisse supposer que son ligand pourrait ne pas être un CMH-I, ou à tout le moins, un CMH-I conventionnel.

L'immunoprécipitation de lysats de cellules C1498 transfectées avec l'ADNc de Ly49B identifie une protéine de 75 kDa (Smith *et al.*, 2000). D'autre part, l'immunobuvardage de type western de lysats des protéines totales de cellules Ly49B<sup>+</sup> provenant de cellules Jurkat J77.6 transfectées révèle plutôt une protéine de 90 kDa

(Lévesque, 2001). Dans les deux cas, l'immunobuvardage a été effectué avec un antisérum reconnaissant un épitope de la portion cytoplasmique des récepteurs Ly49. Le réactif utilisé pour détecter le récepteur Ly49B des cellules Jurkat J77.6 transfectées avec l'ADNc de *Ly49b* a aussi permis de mettre en évidence des protéines de 80 et 130 kDa par immunobuvardage à partir de cellules Jurkat J77.6 transfectées avec l'ADNc de *Ly49a* et *Ly49c* respectivement. Les bandes observées dans ces conditions sont de la même taille que les protéines immunoprécipitées à partir des cellules NK de souris C57BL/6 avec les anticorps A1 (anti-Ly49A) et 4LO3311 (anti-Ly49C) (Yokoyama *et al.*, 1989; Gosselin, Lusignan et Lemieux, 1993).

Deux études ont démontré par RT-PCR la présence d'ARNm de Ly49B chez des cellules de souris. Dans le premier cas, l'analyse individuelle de 80 cellules NK isolées de souris âgées de 8 semaines n'a pas permis de déceler d'ARNm de Ly49B dans aucune d'entre elles (Takei *et al.*, 2001). Par contre, lorsque le test était fait sur un groupe de 1000 cellules NK, l'ARNm de Ly49B était détecté (Kubota *et al.*, 1999a). Donc, si on fait le calcul, moins d'une cellule NK sur 80 (soit <1,25%) exprimerait le récepteur Ly49B. De plus, la proportion de cellules dans lesquelles l'ARNm d'un récepteur Ly49 est détecté semble être légèrement plus élevée que celle détectée par cytométrie en flux tel qu'il a été démontré pour les récepteurs Ly49A, C/I et G (Kubota *et al.*, 1999a). Donc, si le récepteur Ly49B est réellement exprimé par les cellules NK, sa fréquence semble être très faible. L'analyse de 64 cellules NK isolées de souris âgées d'une semaine n'a pas non plus permis de mettre en évidence l'ARNm de Ly49B, ce qui laisse croire que ce récepteur ne serait pas plus exprimé par les cellules NK de souris nouveau-nées.

Dans une autre étude, la même équipe a recherché la présence d'ARNm du récepteur Ly49B dans des précurseurs de cellules NK ( $\text{Lin}^-$ ,  $\text{c-kit}^+$ ) en culture (Williams *et al.*, 2000). Les cellules fraîchement isolées se sont avérées négatives pour la présence d'ARNm de tous les récepteurs Ly49, dont Ly49B. Par contre, suite à une culture de ces cellules en présence d'un mélange de cytokines (IL-7, SCF et flt3L) et à l'enrichissement des cellules ayant un phénotype  $\text{NK1.1}^-$ ,  $\text{IL-2/15R}\beta^+$ , le seul récepteur Ly49 dont l'ARNm a été détecté est Ly49B et ce, même lorsque l'analyse a été faite sur aussi peu que 10

cellules. Ces résultats suggèrent que Ly49B serait exprimé à un stade précoce dans le développement des cellules NK, mais que son expression diminuerait considérablement lors de leur la maturation. Il est toutefois impossible de savoir présentement si ces résultats correspondent réellement à ce qui se passe *in vivo*.

Ly49B demeure donc un récepteur encore très peu caractérisé et le développement d'un anticorps monoclonal qui lui soit spécifique serait un outil essentiel pour faire progresser les connaissances à son sujet.

## **2. Les cellules dont l'activité est régulée par des récepteurs Ly49 ou d'autres récepteurs d'inhibition.**

La différenciation des précurseurs hématopoïétiques à partir desquels se développe le système immunitaire donne des sous-populations appartenant à la lignée lymphoïde comprenant les lymphocytes T, B, NK et NKT et d'autres appartenant à la lignée myéloïde qui regroupe les monocytes/macrophages, les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les mastocytes et les cellules dendritiques. Des cytokines présentes dans l'environnement des précurseurs hématopoïétiques, ainsi que le stroma de la moelle osseuse, orchestrent leur différenciation en cellules matures.

Les cellules qui expriment des récepteurs Ly49 sont principalement les cellules NK et NKT et certains lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires. Une petite population particulière de lymphocyte B exprimerait aussi des récepteurs Ly49. Aucun récepteur Ly49 n'a été détecté chez les cellules de la lignée myéloïde, mais celles-ci expriment tout de même d'autres types de récepteurs ayant une fonction inhibitrice.

### **2.1. Les cellules NK**

#### **2.1.1. Définition, distribution et phénotype**

Les cellules NK ont été découvertes en 1975. Elles ont originalement été décrites comme des grands lymphocytes granuleux n'exprimant pas de récepteurs de cellule T et

B. Contrairement aux récepteurs de ces deux types de lymphocytes, l'expression des récepteurs des cellules NK ne nécessite pas de réarrangement de gènes, ce qui explique leur présence dans les souris RAG<sup>-/-</sup>. Les cellules NK n'ont aucune activité phagocytaire ou de présentation d'antigène. Leur nom, Natural Killer, provient du fait qu'elles ont une activité cytotoxique naturelle contre une variété de cellules tumorales sans aucune stimulation préalable contre celles-ci (Kiessling, Klein et Wigzell, 1975). Les cellules NK se développent dans la moelle osseuse à partir d'un précurseur commun aux lymphocytes T, mais contrairement à ceux-ci, la maturation des cellules NK est indépendante du thymus. On retrouve les cellules NK surtout dans la rate où elles représentent 3 à 5% de la population lymphocytaire et dans la circulation sanguine. Ces cellules sont aussi présentes de façon moins importante dans la moelle osseuse, le foie, les poumons et la muqueuse intestinale (Sivakumar *et al.*, 1998).

Les cellules NK expriment plusieurs récepteurs activateurs ou inhibiteurs qui reconnaissent des molécules du CMH-I, par exemple, les récepteurs des familles CD94/NKG2, Ly49 (pas exprimés chez l'homme) et les KIR (pas exprimés chez la souris). D'autres récepteurs importants qui régulent leurs fonctions, qui ont des ligands différents des CMH ou tout simplement inconnus, sont entre autres CD16 (FcγRIIIA), 2B4, les récepteurs de la famille NKR-P1, CD69, CD44 et CD2. Plusieurs récepteurs de cytokines étant aussi exprimés par les cellules NK, elles peuvent répondre entre autres aux interleukines (IL) IL-2, IL-12, IL-15 et IL-18, ainsi qu'aux différents interférons (Lanier, 1998; Seaman, 2000; Natarajan *et al.*, 2002).

## **2.1.2. Fonctions**

### **2.1.2.1. Fonction cytotoxique**

Les cellules NK utilisent principalement deux moyens pour détruire les cellules cibles. Le premier est la cytotoxicité naturelle. Les cellules NK ont la propriété de pouvoir reconnaître et tuer certaines cellules tumorales ou infectées. Cela est dû à l'absence de reconnaissance des CMH-I dont l'expression est souvent modulée à la baisse par les cellules tumorales ou infectées par un virus (Ljunggren et Kärre, 1990). Lorsque

les CMH-I sont reconnus par les récepteurs d'inhibition présents sur la cellule NK, comme par exemple certains récepteurs Ly49, un signal inhibiteur est enclenché dans la cellule NK et il n'y aura pas de lyse. Par contre si la cellule cible a modulé l'expression de ses CMH-I à la baisse, les signaux inhibiteurs seront insuffisants, ce qui pourra se traduire par la destruction de cette cellule cible par la cellule NK. Bien entendu, pour que la cellule NK puisse s'attaquer à la cellule cible, elle doit d'abord recevoir un signal d'activation via un de ses différents récepteurs, par exemple NK1.1. C'est donc la somme des signaux activateurs et inhibiteurs qui va décider si la cellule NK sera activée ou non (Brumbaugh, Binstadt et Leibson., 1998). Une cellule saine qui exprime un niveau normal de CMH-I provoquera suffisamment de signaux inhibiteurs dans la cellule NK pour que celle-ci ne soit pas activée.

Le deuxième mécanisme de cytotoxicité est possible grâce à l'expression du récepteur CD16 ou FcγRIIIA, dont le ligand est le fragment constant (Fc) des immunoglobulines G (IgG). Ce récepteur permet l'activation des cellules NK qui reconnaissent une cellule tumorale ou infectée recouverte d'anticorps. On nomme ce mécanisme "cytotoxicité dépendante des anticorps" (ADCC). Le récepteur CD16 est exprimé sous forme multimérique et est associé aux protéines adaptatrices CD3ζ ou FcεRIγ qui sont responsables de l'initiation de la transmission intracellulaire du signal d'activation suite à la liaison du récepteur à la partie Fc des IgG (Vély et Vivier, 1996). L'ADCC est sujette à la régulation par l'engagement de récepteurs inhibiteurs, notamment les récepteurs Ly49 au même titre que l'est la cytotoxicité naturelle initiée via d'autres récepteurs d'activation (Karlhofer, Ribaldo et Yokoyama, 1992; Correa, corral et Raullet, 1994).

L'arsenal de combat utilisé par les cellules NK comprend principalement l'exocytose granulaire, ce qui libère diverses molécules toxiques dont notamment la perforine et les granzymes qui sont responsables de la formation de pores et de l'induction de l'apoptose chez la cellule cible. Un autre moyen employé est l'expression des ligands de récepteurs de mort qui induisent l'apoptose des cellules qui expriment les récepteurs

correspondants. Le système le plus connu est celui de Fas/Fas-ligand (Vély et Vivier, 1996).

### 2.1.2.2. Fonction sécrétrice

Un autre rôle important que jouent les cellules NK dans l'immunité est la sécrétion de cytokines et de chimiokines. Lorsqu'elles sont activées, les cellules NK ont la capacité de sécréter rapidement plusieurs cytokines et chimiokines incluant l'IFN $\gamma$ , le GM-CSF, le CSF-1, le TNF $\alpha$ , le TGF $\beta$ , l'IL-3, l'IL-5, l'IL-10, l'IL-13, le MIP-1 $\alpha$ , le MIP-1 $\beta$  et RANTES (Biron *et al.*, 1999; Seaman, 2000). Par la relâche de ces messagers chimiques, les cellules NK ont une grande influence sur le déroulement de la réponse immunitaire en activant ou inhibant les autres cellules du système immunitaire. Les cytokines sécrétées par les cellules NK vont varier en fonction du stimulus reçu.

## 2.2. Les cellules NKT

### 2.2.1. Définition, distribution et phénotype

Les cellules NKT constituent la plus récente famille de lymphocytes à avoir été découverte. Les premières publications sur ces cellules datent de la fin des années 1980 (Bendelac *et al.*, 1997; Godfrey *et al.*, 2000; Wilson et Byrne, 2001; Kronenberg et Gapin, 2002). Comme leur nom l'indique, ce sont des cellules qui ont des propriétés communes aux cellules NK et aux cellules T, mais qui possèdent aussi des caractéristiques qui leur sont propres. Elles ont d'abord été définies comme étant des cellules dont la grande majorité expriment un TCR canonique, c'est-à-dire que les gènes nécessaires à son expression sont restreints à la chaîne V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281 (aussi nommée V $\alpha$ 14*i*) jointe majoritairement aux chaînes V $\beta$ 2, V $\beta$ 7 et V $\beta$ 8.2 chez la souris (V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q et V $\beta$ 11 chez l'homme). Il est à noter que l'expression du TCR des cellules NKT se fait à un niveau plus faible comparativement au TCR des cellules T. De plus, le TCR des cellules NKT ne reconnaît pas des peptides présentés par le CMH, mais plutôt des glycolipides présentés par la molécule non polymorphique CD1d associée à la  $\beta_2m$ , ce qui lui donne une structure semblable aux molécules du CMH-I. Les ligands naturels du TCR

des cellules NKT n'ont pas encore été identifiés, mais l' $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ -GalCer) isolé à partir d'une éponge marine s'est avéré un ligand "artificiel" très utile pour éclaircir les fonctions des cellules NKT. Certaines cellules NKT sont dites "double négatives" (DN), c'est-à-dire qu'elles n'expriment pas les marqueurs CD4 et CD8, tandis que d'autres sont CD4<sup>+</sup>. Certaines cellules T CD8<sup>+</sup> expriment aussi des marqueurs de cellules NK mais ce sont des cellules différentes des NKT conventionnelles et il en sera question dans une autre section. Une autre caractéristique des cellules NKT restreintes par le CD1d est l'expression de récepteurs de cellules NK. Par exemple, chez la souris, elles expriment le récepteur NKR-P1c (aussi appelé NK1.1) ainsi que des récepteurs Ly49 inhibiteurs. Parmi les autres marqueurs associés aux cellules NK qui sont aussi généralement exprimés par les cellules NKT, les récepteurs CD16, CD122 (chaîne  $\beta$  du récepteur IL-2/IL-15), CD49b ( $\alpha_2$ -intégrine reconnue par l'anticorps DX5), et CD94/NKG2A sont les plus importants.

Une caractéristique importante des cellules NKT est qu'elles ont la capacité de sécréter rapidement d'importantes quantités de cytokines suite à leur activation. Ainsi, elles peuvent favoriser le développement d'une réponse immune de type Th2 en sécrétant principalement l'IL-4 et l'IL-10 et de façon moins importante l'IL-5. À l'opposé, il leur est aussi possible de relâcher des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN $\gamma$  et le TNF $\beta$  qui vont plutôt orienter la réponse immunitaire vers un type Th1 (Bendelac *et al.*, 1997).

Les cellules NKT se retrouvent principalement dans 4 organes, soit le thymus, la moelle osseuse, la rate et le foie. On en retrouve aussi en quantité moindre dans le sang, les ganglions lymphatiques, la cavité péritonéale et les poumons. Le développement des cellules NKT n'a pas encore été totalement élucidé, mais il semble de plus en plus probable que ces cellules se développent dans le thymus à partir d'un précurseur commun aux cellules T. Elles passeraient d'abord par un stade "double positive" (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) et seraient sélectionnées positivement pour l'expression du TCR canonique par des cellules exprimant le CD1d (Gapin *et al.*, 2001; MacDonald, 2002). Il est à noter que le développement d'une faible proportion de cellules NKT semble être indépendant du thymus puisque certaines cellules NKT sont présentes, mais de façon beaucoup moins

importante chez des souris nude (*nu/nu*) qui n'ont pas de thymus de même que chez des souris dont le thymus a été enlevé à la naissance. Dans ce cas, les cellules NKT proviennent probablement de la moelle osseuse (Coles et Raulet, 2000). Il est à noter que certaines cellules NKT ne sont pas restreintes par le CD1d car il est possible d'en déceler chez des souris dont le gène *CD1d* a été inactivé, mais encore une fois, le nombre de cellules NKT chez ces souris est grandement diminué (Chen *et al.*, 1997).

La grande diversité des cellules composant la population appelée NKT suscite une certaine controverse dans la communauté scientifique. En effet, il n'existe pas de consensus clair sur la définition d'une cellule NKT. Cette population comprend présentement un groupe hétérogène de cellules. Par exemple, certaines sont DN, d'autres CD4<sup>+</sup> et seulement certains auteurs considèrent sous cette dénomination NKT les cellules T CD8<sup>+</sup> qui expriment des récepteurs de type NK. Certaines cellules NKT ont un TCR canonique, d'autres non, certaines sont restreintes au CD1d, d'autres au CMH conventionnel. La confusion créée par la définition d'une cellule NKT est mise en évidence par trois revues de questions publiées en 2002 par trois équipes ou auteurs différents (Sharif *et al.*, 2002; MacDonald, 2002; Kronenberg et Gapin, 2002). Dans chaque cas, les cellules NKT ont été divisées en sous-population avec des critères plus ou moins différents, ce qui fait que les sous-populations décrites par un auteur ne sont pas les mêmes que celles décrites par les deux autres. Certaines populations se chevauchent mais elles ne sont pas identiques. Donc, un consensus s'impose pour l'établissement d'une définition claire des différentes sous-populations de cellules NKT. Dans le présent mémoire, nous avons analysé l'expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs selon les différents patrons d'expression des molécules CD4 et CD8 par les cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> divisées en sous-populations.

Bien que plusieurs publications aient confirmé la présence de récepteurs Ly49 inhibiteurs à la surface des cellules NKT, la fonction de ces récepteurs chez ces cellules est peu caractérisée. La seule étude qui a évalué cet aspect est celle réalisée par Maeda et collaborateurs (2001). Ces auteurs ont montré que les cellules NKT n'exprimant pas de récepteur Ly49 sont stimulées plus fortement que les cellules Ly49<sup>+</sup> pour la production de

cytokines suite à l'activation par l' $\alpha$ -GalCer présenté par des cellules dendritiques exprimant des CMH-I. Par contre, la différence de la réponse entre les cellules NKT Ly49<sup>+</sup> et NKT Ly49<sup>-</sup> est minime si les cellules dendritiques n'expriment pas de CMH-I. Cela laisse supposer que les cellules NKT Ly49<sup>+</sup> sont inhibées via les récepteurs Ly49 qui interagissent avec les CMH-I des cellules présentatrices d'antigènes (Maeda *et al.*, 2001).

En utilisant des souris transgéniques ou des cellules transfectées pour l'expression d'un récepteur Ly49, d'autres études ont néanmoins montré une inhibition des réponses induites via le TCR par les récepteurs Ly49. Ainsi, la prolifération cellulaire (Sköld et Cardell, 2000; Oberg *et al.*, 2000), la production de cytokines (Roger *et al.*, 2001; Chalifour *et al.*, 2003), la cytotoxicité cellulaire (Zajac *et al.*, 1999; Oberg *et al.*, 2000) et l'expression à la hausse du marqueur précoce d'activation CD69 (Coles *et al.*, 2000) sont toutes des fonctions cellulaires, normalement induite par l'engagement du TCR, qui ont pu être inhibées lors du coengagement de récepteurs Ly49.

## **2.2.2. Fonctions des cellules NKT**

### **2.2.2.1. Fonction sécrétrice : immunomodulation**

Le rôle principal que jouent les cellules NKT dans l'organisme est la sécrétion de cytokines immunomodulatrices qui vont influencer le déroulement des réponses immunitaires. En effet, selon le mode d'activation, les cellules NKT ont la capacité de faire pencher la balance vers une réponse de type Th1 ou Th2. Par exemple, l'activation via leur TCR va les stimuler à produire à la fois de l'IL-4 (Th2) et de l'IFN $\gamma$  (Th1) (Chen et Paul, 1997), tandis que la stimulation via le récepteur NK1.1 va faire augmenter seulement la sécrétion d'IFN $\gamma$  (Th1) (Arase, Arase et Saito, 1996). Des cytokines peuvent aussi activer les cellules NKT; l'IL-12 va favoriser la relâche d'IFN $\gamma$  (Th1) (Leite-de-Moraes *et al.*, 1998) alors que l'IL-7 va les stimuler à produire de l'IL-4 (Th2) (Hameg *et al.*, 1999; Leite-de-Moraes *et al.*, 1997). L'IL-18 peut agir comme co-stimulateur et avoir des effets opposés. Par exemple, en combinaison avec l'IL-12, il y aura une production accrue d'IFN $\gamma$  par les cellules NKT (Leite-de-Moraes *et al.*, 1999). Par contre, l'IL-18 va favoriser la sécrétion d'IL-4 par des cellules activées par l' $\alpha$ -GalCer (Leite-de-Moraes *et*

*al.*, 2001). Donc, en fonction de leur microenvironnement, les cellules NKT ont la capacité de produire différentes cytokines qui vont influencer l'initiation et le déroulement de la réponse immunitaire.

Plusieurs études ont prouvé la capacité des cellules NKT à activer les autres cellules effectrices de l'immunité. Ainsi, les cellules NKT sont en mesure d'activer les cellules T (Eberl, Brawand et MacDonald, 2000), les cellules B (Kitamura *et al.*, 2000), les cellules NK (Carnaud *et al.*, 1999; Eberl et MacDonald, 2000) et les cellules présentatrices d'antigènes (Tomura *et al.*, 1999). Elles sont aussi capable de stimuler la prolifération de progéniteurs myéloïdes et la migration des neutrophiles de la moelle osseuse vers la périphérie (Leite-de-Moraes *et al.*, 2002). Un bon exemple de la communication entre les cellules est l'activation via le TCR d'une cellule NKT par une cellule dendritique. L'activation de la cellule NKT via son TCR va stimuler sa production de cytokines, particulièrement de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-4. L'expression du ligand de CD40 par la cellule NKT sera aussi modulée à la hausse. Étant donné que les cellules dendritiques expriment le CD40, elles seront par le fait même activées via ce récepteur, ce qui leur fera sécréter de l'IL-12. Cette même cytokine va ensuite stimuler une production encore plus forte d'IFN $\gamma$  par la cellule NKT, ce qui va finalement activer d'autres cellules comme les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques (revu par Bendelac *et al.*, 1997).

Le pouvoir immunomodulateur des cellules NKT peut parfois être néfaste pour l'organisme. En effet, la suractivation de ces cellules est responsable d'hépatites suite à l'injection de concanavalin A ou d' $\alpha$ -GalCer (Osman *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2000). Heureusement, les cellules NKT meurent rapidement par apoptose suite à leur activation, ce qui contribue à diminuer les risques de développement de maladies autoimmunes (Eberl et MacDonald, 1998; Takeda *et al.*, 2000).

#### **2.2.2.2. Prévention de maladies autoimmunes**

Les cellules NKT jouent un rôle important dans la prévention de maladies autoimmunes. Le cas le plus étudié est celui du diabète de type 1, caractérisé par

l'insuffisance de la production d'insuline par le pancréas suite à la destruction autoimmune des cellules responsables de sa production. La souris diabétique non obèse (NOD) constitue un modèle animal bien établi de cette maladie. Le diabète de type 1 se développe spontanément chez cette souche. Le nombre de cellules NKT ainsi que leurs capacités sécrétrices sont grandement diminués chez cette souris (Poulton *et al.*, 2001). Par contre, le traitement *in vivo* de ces souris avec l' $\alpha$ -GalCer, de même que le transfert de cellules NKT provenant de souris saines préviennent le développement de la maladie (Hammond *et al.*, 1998; Sharif *et al.*, 2001). De plus, le diabète se développe plus rapidement chez les souris NOD CD1<sup>-/-</sup> (Wang, Geng et Wang, 2001).

Les cellules NKT jouent un rôle dans la prévention de plusieurs autres maladies autoimmunes dont la sclérose en plaque, le lupus érythémateux et l'encéphalomyélite allergique expérimentale (Godfrey *et al.*, 2000; Sharif *et al.*, 2002; Kronenberg et Gapin, 2002).

### 2.2.2.3. Régulation de l'immunité anti-tumorale

Les cellules NKT ont la capacité de lyser les cellules tumorales directement ou indirectement en activant d'autres cellules. Par exemple, les souris déficientes en cellules NKT (J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup>) sont plus susceptibles de développer une tumeur induite par l'injection de méthylcholanthrène (Smyth *et al.*, 2000). L'activation des cellules NKT par l'IL-12 et l' $\alpha$ -GalCer s'est aussi avérée efficace dans la prévention et le contrôle des tumeurs (Cui *et al.*, 1997; Kawano *et al.*, 1998). Une expérience intéressante, qui ouvre peut-être une porte à une thérapie anti-tumorale impliquant les cellules NKT, a été faite par Toura et collaborateurs (1999). L'injection, à une souris, de cellules dendritiques présentant l' $\alpha$ -GalCer permet en effet d'activer spécifiquement les cellules NKT et de combattre de façon efficace le développement de tumeurs hépatiques. Par contre, un autre groupe a observé que les cellules NKT peuvent représenter un couteau à deux tranchants dans la lutte contre le cancer. En effet, dans un modèle expérimental où la régression de tumeurs se fait normalement grâce à l'action des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, il est possible d'inhiber l'activité cytotoxique de ces cellules avec l'IL-13 relâchée par les cellules NKT, ce qui se

traduit par la progression du développement de la tumeur (Terabe *et al.*, 2001). Cette expérience prouve qu'il faudra être prudent avant d'utiliser les cellules NKT comme thérapie anti-cancer car leur réponse dépend de leur mode de stimulation.

#### 2.2.2.4. Lutte contre des agents infectieux

Il semble que les cellules NKT soient impliquées dans la prévention de maladies infectieuses. Plusieurs études ont montré qu'elles jouent un rôle important pour combattre des infections virales, bactériennes ainsi que des infections parasitaires causées par des protozoaires. Par exemple, on sait que ces cellules sont impliquées dans la lutte contre des infections causées par les microorganismes des genres *Borrelia*, *Cryptococcus*, *Plasmodium*, *Tripanosoma*, *Leishmania* ainsi que celle causée par le virus de l'hépatite B (Godfrey *et al.*, 2000; Biron et Brossay, 2001; Gumperz et Brenner, 2001; Kronenberg et Gapin, 2002). Dans certains cas, une activation par l' $\alpha$ -GalCer est nécessaire pour que les cellules NKT puissent jouer leur rôle protecteur.

### 2.3. Les cellules T CD8<sup>+</sup>

Les cellules T CD8<sup>+</sup> qui expriment des récepteurs Ly49 se distinguent des cellules NKT conventionnelles à plusieurs niveaux. D'abord, chez des souris NK1.1<sup>+</sup>, seulement une portion de ces cellules expriment le récepteur NK1.1. De plus, le répertoire des gènes codant pour leur TCR est varié et celui-ci est dépendant du CMH-I et non pas de CD1d (Coles *et al.*, 2000). Ces cellules ont la capacité de sécréter de l'IFN $\gamma$  mais pas de l'IL-4 (Emoto *et al.*, 2000). Elles se retrouvent surtout dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques. Une autre caractéristique importante des cellules T CD8<sup>+</sup>Ly49<sup>+</sup> est qu'elles ont un phénotype de cellules mémoires (CD44<sup>high</sup>Ly6C<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) et leur proportion augmente avec l'âge (Coles *et al.*, 2000 et revu par Ugolini et Vivier, 2000). En effet, environ le quart des cellules T CD8<sup>+</sup> mémoires expriment au moins un récepteur Ly49 inhibiteur (parmi Ly49A, C, I, F et G2) chez une souris jeune (deux mois et demi), alors que plus du tiers de ces cellules sont Ly49<sup>+</sup> chez une souris âgée de 11 mois (Coles *et al.*, 2000). Il semble donc que l'expression de récepteurs Ly49 par les cellules CD8<sup>+</sup>

mémoires est favorisée quand les cellules ont été en contact avec l'antigène. Quelques études ont d'ailleurs noté l'augmentation du nombre de ces cellules suite à des infections virales (Kambayashi *et al.*, 2000; Peacock *et al.*, 2000). Les récepteurs Ly49 peuvent inhiber la cytotoxicité des cellules T CD8<sup>+</sup> cultivées et activées via leur TCR de même que la cytotoxicité de cellules isolées d'une souris transgénique pour l'expression du récepteur Ly49A (Coles *et al.*, 2000; Peacock *et al.*, 2000; Zajac *et al.*, 1999).

#### 2.4. Les cellules B-1

Les cellules B-1 constituent une population particulière de lymphocytes B. Elles sont caractérisées par la coexpression d'un récepteur pour l'antigène (BCR) et du récepteur CD5, molécule surtout associée aux lymphocytes T. On sait maintenant que certaines cellules B-1 n'expriment pas CD5, mais celles-ci possèdent les mêmes propriétés que les cellules B-1 conventionnelles. Le phénotype des cellules B-1 est CD45R (B220<sup>lo</sup>), IgM<sup>hi</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD43<sup>+</sup> et IgD<sup>lo</sup>. Elles constituent la majeure partie des cellules B présentes dans les cavités péritonéale et pleurale tandis que dans la rate elles représentent environ 5% du total de la population de cellules B. Contrairement aux cellules B conventionnelles, la stimulation via le BCR va induire l'apoptose chez les cellules B-1. Par contre, elles ont normalement une longue durée de vie *in vivo* et *in vitro*. Elles semblent être la source principale des IgM naturelles, ce qui leur confère un rôle dans la protection contre les infections bactériennes et contre des maladies autoimmunes. Les cellules B-1 sont aussi impliquées dans la production d'IgA dans les muqueuses. Par contre, il semblerait qu'un mauvais fonctionnement de ces cellules pourrait entraîner des maladies autoimmunes (Su et Takahovsky, 2000; Berland et Wortis 2002).

Une seule étude a montré la présence de récepteurs Ly49 sur les cellules B-1. Ochi et Watanabe (2000) ont observé chez au moins deux souches de souris (C57BL/6 et BALB/c), que les cellules B-1 de la cavité péritonéale expriment des récepteurs Ly49. De plus, ces récepteurs peuvent recruter la phosphatase SHP-1 pour contrer les signaux enclenchés via le BCR. Il a été démontré que l'engagement du BCR par un anticorps anti-IgM provoque l'arrêt de la croissance de la cellule et parfois même l'apoptose. L'effet

inhibiteur des récepteurs Ly49 a permis la restauration de la prolifération cellulaire même si le BCR était stimulé.

## **2.5. Les cellules de la lignée myéloïde**

Bien que cette lignée comprenne plusieurs types cellulaires, seuls les monocytes/macrophages et les granulocytes seront traités dans cette section.

### **2.5.1. Les monocytes/macrophages**

Ces cellules mononucléées issues de la lignée myéloïde proviennent de la moelle osseuse en se développant à partir d'un précurseur commun granulocyte-monocyte. Celui-ci se différencie en promonocyte qui va quitter la moelle pour se diriger dans la circulation sanguine. À ce stade, la cellule se différencie en monocyte. Cette cellule va ensuite migrer dans les tissus ainsi qu'aux sites d'inflammation tout en se différenciant en macrophage. Les macrophages sont des effecteurs importants de l'immunité naturelle. Ils font partie de la première ligne de défense contre les infections. Ils ont la capacité d'ingérer puis de détruire les particules phagocytées, que celles-ci soient d'origine exogène comme des microorganismes ou endogène comme des débris cellulaires. Les macrophages produisent à cet effet plusieurs substances cytotoxiques. L'arsenal cytotoxique des macrophages est composé de réactifs intermédiaires de l'oxygène et de l'azote, notamment l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxyde nitrique (NO), etc. Ces réactifs contribuent à la cytotoxicité dépendante de l'oxygène. D'autres moyens de cytotoxicité sont indépendants de l'oxygène, ils comprennent divers peptides antimicrobiens ou enzymes hydrolytiques comme les défensines et les lysozymes, ils sont relâchés lors du processus de dégranulation. Une fonction importante du macrophage et qui aura une grande influence sur le déroulement de la réponse immunitaire est la présentation de l'antigène. En effet, une partie des particules phagocytées seront dégradées en peptides présentés par les CMH-II aux cellules T auxiliaires. Les macrophages peuvent être activés de diverses façons, l'une des plus importantes étant la reconnaissance de composants de la paroi de microorganismes

comme le LPS. Ils peuvent aussi reconnaître des microorganismes recouverts d'anticorps ou de protéines du complément. Une autre voie d'activation est via des cytokines, particulièrement l'IFN $\gamma$ . La phagocytose et la présentation d'antigène se feront de façon plus efficace par un macrophage activé car l'expression de CMH-II et de molécules de costimulation sera augmentée. Le macrophage a une capacité sécrétrice importante. Ainsi, cette cellule peut sécréter diverses cytokines et autres protéines favorisant la réponse inflammatoire (notamment l'IL-1, l'IL-6, le TNF $\alpha$ , des protéines du complément et des enzymes hydrolytiques), de même que d'autres cytokines pouvant activer d'autres cellules (telles l'IFN $\alpha$ , le GM-CSF, le G-CSF et le M-CSF) (Goldsby, Osborne et Kindt, 2000).

### **2.5.2. Les granulocytes polymorphonucléaires**

Selon leurs caractéristiques morphologiques et le type de colorant marquant leurs granules, les granulocytes peuvent être divisés en trois types cellulaires, soit les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les éosinophiles ont un noyau bilobé et des granules cytoplasmiques marqués par un colorant acide. Ils constituent entre 1 et 3% des leucocytes présents dans le sang. Ils seraient principalement impliqués dans la lutte contre les parasites. Les basophiles ont un noyau formé d'un seul lobe et leur cytoplasme contient beaucoup de granules marqués par un colorant basique. Leur fonction n'est pas clairement définie, mais on croit qu'ils auraient une activité sécrétrice importante dans les réponses allergiques. Ces cellules qui n'ont pas de capacité phagocytaire, représentent moins de 1% des globules blancs du sang. Les neutrophiles sont les cellules principales formant le groupe des granulocytes. Ils constituent entre 50 et 70% des leucocytes présents dans le sang. Ils ont un noyau multilobé et leur cytoplasme contient des granules qui peuvent être marqués par des colorants acides ou basiques. Les neutrophiles sont des cellules très sensibles à plusieurs chimioattractants, ce qui leur permet d'être parmi les toutes premières cellules à migrer aux sites d'inflammation. La fonction principale des neutrophiles est la phagocytose. Tout comme les macrophages, les neutrophiles utilisent la dégranulation pour relâcher plusieurs enzymes hydrolytiques, protéines et peptides antimicrobiens, ce qui permet la destruction des microorganismes phagocytés. De plus, ils sont encore plus efficaces que les macrophages pour produire des réactifs intermédiaires

de l'oxygène et de l'azote. Une caractéristique importante des neutrophiles est leur très courte durée de vie. En effet, ces cellules meurent spontanément par apoptose après quelques jours dans la circulation sanguine ou après leur migration aux sites d'inflammation. Elles sont rapidement remplacées par de nouveaux neutrophiles issus de la moelle osseuse (Goldsby, Osborne et Kindt, 2000).

### 2.5.3. Récepteurs d'inhibition exprimés par les cellules myéloïdes

À ce jour, aucune publication n'a rapporté l'expression de récepteurs Ly49 par des cellules de la lignée myéloïde. Par contre, d'autres types de récepteurs inhibiteurs sont exprimés par ces cellules. Chez la souris, le récepteur PIR-B (Paired immunoglobulin-like receptor) participe à l'inhibition de l'activité cellulaire. La famille PIR comprend des récepteurs activateurs (PIR-A) et inhibiteur (PIR-B). Huit gènes *Pir-a* ont été identifiés alors qu'il n'existe qu'un seul gène *Pir-b*. Ces glycoprotéines de type I ont une portion extracellulaire très similaire comprenant six domaines Ig et présentent plus de 92% d'homologie au niveau de leur séquences en acides aminés (Kubagawa *et al.*, 1999; Takai et Ono, 2001). PIR-A ne possède qu'une toute petite portion intracellulaire, mais a un acide aminé chargé dans la portion transmembranaire, ce qui lui permet de s'associer à la chaîne  $\gamma$  commune des récepteurs Fc (FcR $\gamma$ ) qui est responsable de la transmission du signal activateur. À l'opposé, PIR-B ne possède pas d'acide aminé chargé transmembranaire, mais sa portion intracellulaire est beaucoup plus longue et contient quatre séquences ITIM. Par ailleurs, il semblerait que ce ne sont pas tous les ITIM qui sont essentiels à l'activité inhibitrice de PIR-B via le recrutement des phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Bléry *et al.*, 1998). Les récepteurs PIR sont exprimés par plusieurs types de cellules hématopoïétiques, soit les monocytes/macrophages, les granulocytes, les mastocytes, les mégakariocytes/plaquettes sanguines, ainsi que par les lymphocytes B. Les ligands de ces récepteurs ne sont pas encore connus, mais des indices laissent croire que ce sont probablement des CMH-I ou d'autres molécules apparentées. En effet, les tyrosines de PIR-B sont moins phosphorylées chez les souris déficientes en  $\beta_2m$ , ce qui indique que les CMH-I semblent avoir une certaine importance pour l'activité fonctionnelle de ces récepteurs (Ho *et al.*, 1999). De plus, il a récemment été montré que

PIR-B pouvait se lier à HLA-G qui est un CMH humain de classe Ib (Liang, Bailakov et Horuzsko, 2002). Même si HLA-G n'est pas le ligand naturel de PIR-B, cela prouve tout de même la possibilité de liaison entre PIR-B et ce type de molécules. La fonction inhibitrice du récepteur PIR-B a été démontrée chez des cellules B dans lesquelles le coengagement des récepteurs PIR et du BCR a inhibé la mobilisation du calcium intracellulaire normalement initiée suite à l'activation via le BCR (Bléry *et al.*, 1998). La même équipe a utilisé des cellules RBL-2H3 (lignée de basophiles de rat), transfectées pour l'expression du récepteur PIR-B, pour vérifier la capacité de ce récepteur à inhiber la sécrétion de sérotonine suite à son coengagement avec le FcεRI (Bléry *et al.*, 1998). Les deux mêmes fonctions (mobilisation du calcium et sécrétion de sérotonine) ont aussi pu être inhibées par le récepteur PIR-B chez des mastocytes (Uehara *et al.*, 2001).

Les récepteurs PIR ne sont pas exprimés chez l'homme. Par contre, d'autres récepteurs appartenant aussi à la superfamille des immunoglobulines jouent un rôle semblable aux PIR. En effet, différents membres de la famille des ILT/LIR/MIR (Ig-like transcripts / leucocyte Ig-like receptors / monocytes-macrophages Ig-like receptors) servent de récepteurs d'activation ou d'inhibition sur différents types de leucocytes. Certains ligands de ces récepteurs ont été identifiés; ce sont des molécules de classe I du CMH (Colonna *et al.*, 1999; Allan, McMichael et Braud, 2000; Katz, 2002).

Un autre récepteur inhibiteur exprimé chez la souris est le récepteur gp49B (aussi nommé gp49B1). Cette protéine, ainsi que le récepteur gp49A (activateur), font partie de la superfamille des immunoglobulines. Le récepteur gp49B est exprimé par plusieurs cellules de la lignée myéloïde dont les macrophages et les mastocytes. Son expression peut aussi être induite sur les cellules NK (Wang *et al.*, 2000). Le récepteur gp49B possède deux séquences ITIM qui lui permettent le recrutement et l'activation de la phosphatase SHP-1 suite à la liaison à son ligand, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Castells *et al.*, 2001). La capacité inhibitrice de gp49B a été observée notamment dans la suppression de l'activation via le récepteur FcεRI, dans l'inhibition de la relâche de cytokines et de facteurs proinflammatoires, ainsi que de l'ADCC par les cellules NK (revu par Katz, 2002).

FcγRIIB est un autre récepteur inhibiteur important dans la régulation de l'activité des macrophages, des neutrophiles et des mastocytes (Ravetch et Lanier, 2000; Gerber et Mosser, 2001; Katz, 2002). Il est aussi exprimé par les lymphocytes B. On le retrouve tant chez l'homme que chez la souris. Tel que son nom l'indique, il fait partie de la grande famille des récepteurs Fc. FcγRIIB reconnaît le fragment constant des IgG. Ce récepteur est impliqué dans l'inhibition de fonctions telles que la dégranulation, la phagocytose, l'ADCC et la relâche de cytokines. Bien que ce récepteur d'inhibition possède une séquence ITIM dans sa portion intracellulaire, c'est via le recrutement des phosphatases SHIP, et non pas SHP-1, que le récepteur FcγRIIB peut réguler l'activité cellulaire. D'autres récepteurs de la famille Fcγ sont aussi exprimés par les cellules myéloïdes mais ils ont une fonction activatrice.

### **3. Modulation de l'expression des récepteurs Ly49 et autres récepteurs associés aux cellules NK**

#### **3.1. Modulation lors d'infections**

L'expression des récepteurs Ly49 par les cellules NK peut aussi être modulée en fonction des médiateurs solubles présents dans leur environnement, particulièrement lors d'infections virales. L'infection la plus étudiée est celle causée par le MCMV. Il est maintenant connu que c'est le récepteur Ly49H qui confère la résistance de certaines souches de souris à ce virus. Pour en arriver à cette conclusion, différents groupes se sont intéressés à l'effet d'une infection par MCMV sur les différentes sous-populations de cellules NK Ly49<sup>+</sup>. Ils ont découvert que la modulation induite dans le cours de l'infection est différente selon le récepteur Ly49 étudié (Ly49A, C, C/I, D, G2 et H) et l'organe d'où proviennent les cellules (Depatie *et al.*, 1999; Tay *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2001; Dokun *et al.*, 2001). La sous-population de cellules NK dont la prolifération semble la plus stimulée dans ces conditions est naturellement celle exprimant le récepteur Ly49H. Toutefois, Ly49G2 est un autre récepteur dont le niveau d'expression est modulé à la hausse de façon importante suite à l'infection par MCMV (Depatie *et al.*, 1999). Daniels et collaborateurs ont aussi observé des effets similaires sur les cellules NK Ly49<sup>+</sup> lors de l'infection par trois autres virus (le "lymphocytic choriomeningitidis virus"

(LCMV), le virus de la vaccine et le virus de l'hépatite murine) même si ces infections ne sont pas régulées principalement par les cellules NK (Daniels *et al.*, 2001). Un autre récepteur dont l'expression est modulée à la hausse sur les cellules NK par le MCMV est gp49B. Cette protéine n'est pas détectée sur les cellules NK de souris non infectées, mais le devient suite à l'infection par le MCMV (Wang *et al.*, 2000)

Dans le cas des cellules T exprimant des récepteurs Ly49, il a aussi été démontré que la prolifération de ces cellules peut être stimulée. Encore une fois, les preuves expérimentales ont été faites surtout dans des cas d'infections virales. Cela est particulièrement vrai pour les cellules T CD8<sup>+</sup>. En temps normal, chez une souris saine, très peu de ces cellules coexpriment des récepteurs Ly49 (Coles *et al.*, 2000). Par contre, lors d'infections avec le LCMV et le virus influenza, différentes équipes ont observé une hausse importante de la proportion de cellules T CD8<sup>+</sup>Ly49<sup>+</sup> spécifiques au virus inducteur (Peacock *et al.*, 2000; Kambayashi *et al.*, 2000). Les résultats de ces expériences suggèrent que les récepteurs Ly49 peuvent réguler les réponses des cellules T induites par une infection virale. Par contre, il semble que la réponse des cellules T CD8<sup>+</sup>Ly49<sup>+</sup> peut varier selon le récepteur Ly49 car une autre étude faite avec le virus LCMV n'a pas montré d'augmentation significative de la proportion des cellules CD8<sup>+</sup> exprimant les récepteurs Ly49C/I/F/H (McMahon *et al.*, 2002). Dans ce cas-ci, les chercheurs ont fait leurs analyses sur un ensemble de récepteurs, tandis que Peacock et collaborateurs (2000) se sont concentrés sur la population CD8<sup>+</sup>Ly49G2<sup>+</sup>. Dans le cas des résultats de McMahon, il est possible que la hausse de l'expression d'un récepteur ait été compensée par la baisse d'un autre, ce qui se serait traduit par la même proportion de cellules CD8<sup>+</sup>Ly49<sup>+</sup>.

CD49b (reconnu par l'anticorps DX5) est un autre marqueur de cellule NK qui peut être modulé lors d'une infection virale. En effet, environ 5% des cellules T CD8<sup>+</sup> de souris non infectées expriment cette protéine. Par contre, 10 jours après une infection par le virus influenza, près de la moitié de cette même population exprime l'antigène reconnu par l'anticorps DX5. Ces cellules T ont un phénotype de cellules activées et meurent rapidement par apoptose (Kambayashi *et al.*, 2001).

Il semble que certaines infections parasitaires peuvent aussi influencer le répertoire des récepteurs Ly49 exprimés par les cellules NK. Lors d'une infection expérimentale de la souris BALB/c par le vers *Litomosoides sigmodontis*, Korten et collaborateurs (2002) ont observé une baisse de la proportion des cellules NK (CD3<sup>-</sup>DX5<sup>+</sup>) exprimant les récepteurs Ly49A, Ly49C et Ly49G2 au site d'infection. Par contre, la proportion de cellules NK n'exprimant pas ces récepteurs a augmenté dans les mêmes conditions. Les auteurs suggèrent que cette diminution de l'expression des récepteurs Ly49 serait nécessaire pour augmenter l'efficacité de la défense immunitaire des cellules NK contre le parasite.

### 3.2. Modulation par des cytokines

La contribution des cytokines IL-2 et particulièrement IL-15 dans la régulation de l'expression des récepteurs Ly49 est bien établie. Le traitement de souris avec de l'estradiol détruit la moelle osseuse, ce qui affecte la maturation des cellules NK; l'expression des récepteurs Ly49 est alors grandement diminuée sur ces cellules. Par contre, leur culture en présence d'IL-15 permet de compléter leur maturation et de restaurer l'expression des récepteurs Ly49 à un niveau normal (Puzanov, Bennett et Kumar, 1996). Judge et collaborateurs (2002) ont quant à eux montré l'importance de l'IL-15 pour la survie des cellules CD8<sup>+</sup>CD122<sup>hi</sup>CD44<sup>hi</sup>Ly49<sup>+</sup>. En effet, ces cellules sont presque totalement absentes dans les souris qui ne peuvent produire d'IL-15 (IL15<sup>-/-</sup>), alors que les cellules T CD8<sup>+</sup> conventionnelles ne sont pas affectées. Dans le cas des souris IL-2<sup>-/-</sup>, ces mêmes cellules CD8<sup>+</sup>CD122<sup>hi</sup>CD44<sup>hi</sup>Ly49<sup>+</sup> sont présentes, mais encore à un niveau moindre que dans les souris normales. Ces deux dernières études ne prouvent pas que l'IL-15 influence directement l'expression des récepteurs Ly49, elles démontrent néanmoins son importance dans le développement des cellules qui les expriment. Un autre groupe a étudié l'importance de l'IL-2 sur l'expression des récepteurs Ly49, cette fois-ci en comparant leur expression par des cellules CD8<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> (Assarsson *et al.*, 2000). Les chercheurs ont remarqué que la culture en présence d'IL-2 fait augmenter la proportion des cellules exprimant des récepteurs Ly49 pour les deux groupes de cellules, mais l'augmentation est beaucoup plus importante dans le cas des

cellules CD8<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>. Reichlin et Yokoyama (1998) ont aussi étudié l'effet de l'IL-2 sur l'expression des récepteurs Ly49, mais dans ce cas-ci, par les cellules NK. Une culture en présence de fortes concentrations d'IL-2 n'a pas fait varier les fréquences des cellules exprimant les récepteurs Ly49A, Ly49C/I et Ly49G2 par les cellules NK. Par contre, le niveau d'expression du récepteur Ly49A semble diminuer dans ces conditions. Le même traitement a fait augmenter la proportion de cellules NK exprimant le marqueur CD69 tandis que la proportion de cellules NK exprimant NK1.1 a diminué. De plus, Chakir et collaborateurs (2000) ont remarqué que dans des cultures de cellules NK en présence d'une forte concentration d'IL-2, deux sous-populations définies sur la base de l'expression de la chaîne  $\beta 2$  du récepteur de l'IL-12 (IL-12R $\beta 2$ ) se développent. Ainsi, ils ont comparé l'expression des récepteurs Ly49A, Ly49C et Ly49G2 par les cellules NK IL-12R $\beta 2^{\text{lo}}$  et IL-12R $\beta^{\text{hi}}$ . Alors que les récepteurs Ly49A et Ly49C sont répartis uniformément entre les deux sous-populations, Ly49G2 est exprimé presque uniquement par les cellules NK IL-12R $\beta^{\text{hi}}$  (Chakir *et al.*, 2000). Cependant, la conséquence physiologique de cette observation n'a pas été déterminée. La culture de cellules NK humaines en présence d'IL-12 a fait augmenter le niveau d'expression du récepteur NKR-P1A (CD161), mais n'a pas eu d'effet sur l'expression d'autres molécules telles que CD16, CD94 et différents KIR (Poggi *et al.*, 1998, Azzoni *et al.*, 1998). Chez l'humain, l'augmentation de l'expression de NKR-P1A par l'IL-12 se traduit par une capacité fonctionnelle à inhiber l'activité lytique des cellules activées via les récepteurs CD16 ou p46 (Poggi *et al.*, 1998). La culture des mêmes cellules NK en présence d'IL-2 et d'IL-15 n'a pas eu d'effet sur l'expression de NKR-P1A (Poggi *et al.*, 1998, Azzoni *et al.*, 1998). Chez les cellules T CD8<sup>+</sup> humaines, la culture en présence d'IL-12 favorise l'expression du récepteur d'inhibition CD94/NKG2A. De plus, cet effet de l'IL-12 est indépendant de la présence de l'IL-15 et de l'IFN $\gamma$  (Derre *et al.*, 2002). En plus de l'IL-12, l'IL-15 et le TGF $\beta$  sont deux autres cytokines reconnues pour induire l'expression de CD94/NKG2A par les cellules T CD8<sup>+</sup> humaines (Mingari *et al.*, 1998; Bertone *et al.*, 1998). L'expression d'au moins un autre récepteur de la famille NKG2 peut être modulée par des cytokines. En effet, la culture de macrophages de souris en présence d'IFN $\gamma$  ou d'IFN $\alpha/\beta$  module l'expression de NKG2D à la hausse par ces cellules tandis que le TNF $\alpha$  n'a pas d'effet (Jamieson *et al.*, 2002). Finalement, gp49B est un autre récepteur dont l'expression

peut être augmentée par au moins une cytokine. Ce récepteur d'inhibition est surtout exprimé par les cellules de la lignée myéloïde et ne peut être détecté chez des cellules NK non stimulées. Par contre, suite à une culture de cellules NK murines en présence d'IL-2, la protéine gp49B est exprimée par ces cellules et peut être détectée par cytométrie en flux (Rojo *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997).

En conclusion, l'expression de plusieurs récepteurs de type NK peut être modulée tant sur les cellules NK que sur les lymphocytes T, par diverses cytokines et ce autant chez la souris que chez l'humain.

#### **4. Objectifs du projet**

Le projet de recherche présenté dans ce mémoire comporte deux volets qui ont comme point commun les récepteurs Ly49.

Le niveau d'expression des récepteurs Ly49 est modulé au cours de la différenciation cellulaire et également dans certaines conditions d'activation. Les travaux de différentes équipes, incluant ceux de notre laboratoire, ont établi que le niveau d'expression des récepteurs Ly49 détermine leur capacité de réguler l'activité cellulaire. Étant donné que plusieurs cytokines jouent un rôle fondamental pour l'activation des cellules exprimant des récepteurs Ly49 et que la modulation de l'expression de ces récepteurs par des cytokines a été très peu étudiée, nous avons comparé, dans la première partie du projet, l'expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs sur différentes sous-populations de cellules T avec celle des cellules NK. Nous avons ensuite mesuré l'effet de cytokines sur la modulation de l'expression de ces récepteurs d'inhibition reconnus par des anticorps qui réagissent avec Ly49A, C, C/I et G2. L'action de l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-15 a été testée. Cette dernière cytokine, l'IL-15, est reconnue pour être particulièrement importante dans l'homéostasie, le développement et la survie des cellules NK, NKT et de certains lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (revu par Ledolce *et al.*, 2002).

La deuxième partie du projet concerne la caractérisation de l'expression et des propriétés fonctionnelles du récepteur Ly49B. Ces études ont pu être effectuées grâce à la sélection, par une autre étudiante à la maîtrise, d'un hybridome produisant un anticorps réagissant spécifiquement avec des cellules Jurkat transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49B (Lévesque, 2001). Les résultats présentés ci-après démontrent que ce récepteur se distingue nettement des autres récepteurs Ly49, pas uniquement par sa structure et sa régulation génétique particulière, mais également par une distribution unique sur les cellules de la lignée myéloïde.

### III. MÉTHODOLOGIE

#### 1. Souris

Les souches de souris C57BL/6, BALB/cAn, C3H/He, DBA/2 et 129/Sv provenaient toutes de Charles River Inc. (St-Constant, Québec, Canada). Nous avons utilisé des mâles et des femelles de 6 à 12 semaines gardés dans un environnement sans pathogène. Toutes les souris ont été sacrifiées par asphyxie au CO<sub>2</sub>.

#### 2. Enrichissements cellulaires

##### 2.1 Rate

L'enrichissement a été effectué selon une procédure décrite précédemment (Morelli et Lemieux, 1993). La rate des souris sacrifiées a été prélevée et triturée dans un volume minimal de RPMI complet (RPMIc) composé de RPMI 1640 avec L-glutamine (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) additionné de 100 unités/ml (U/ml) de pénicilline, de 100 µg/ml de streptomycine (Gibco) et d'acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonique 25mM (HEPES; Fisher Scientific Ltd., Nepean, Ontario). Après élimination des érythrocytes par choc osmotique avec de l'eau distillée, les cellules ont été passées à deux reprises sur une colonne de laine de nylon (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA) avec une incubation de 45 min à 37°C à chaque fois. Selon la population cellulaire recherchée, les cellules non adhérentes à la laine de nylon, qui contiennent des lymphocytes T et des cellules NK, ont été incubées 30 min à 4°C en présence d'un anticorps de rat anti-CD4 de souris (clone MT4, donné par le Dr Édouard Potworowski, INRS-Institut Armand-Frappier) ou d'un anticorps de rat anti-CD8 de souris (clone 53-6.72 provenant de l'American type culture collection (ATCC), Rockville, MD, USA) ou des anticorps des deux spécificités, de même que d'un anticorps de rat anti-CD24 ("Heat Stable Antigen") de souris (clone M1/69, ATCC). L'anti-CD24 permet d'éliminer les populations résiduelles d'érythrocytes, de cellules B et celles de la lignée myéloïde. Après deux lavages pour éliminer les anticorps libres, les cellules ont été incubées 30 min à 4°C en présence de billes magnétiques couplées à des immunoglobulines de mouton anti-IgG

de rat (Dynal Inc., Great Neck, NY, USA). Les cellules liées aux billes ont finalement été séparées des autres cellules en utilisant un aimant (Dynal). Selon les combinaisons d'anticorps utilisées pour la déplétion, on obtient ainsi des suspensions contenant surtout des cellules NK et des lymphocytes T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> auxquelles s'ajoutent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> si une seule de ces deux populations a été éliminée.

## **2.2 Moelle osseuse**

Les fémurs et tibias des souris sacrifiées ont été prélevés. Les deux extrémités de l'os ont été coupées et la moelle osseuse a été expulsée par l'injection de RPMIc dans l'os en utilisant une seringue de 10 ml munie d'une aiguille 23G. Les érythrocytes ont été lysés par choc osmotique avec de l'eau distillée. Les cellules ont été resuspendues dans du RPMIc.

## **2.3 Thymus**

Pour le prélèvement du thymus, la souris sacrifiée a d'abord été exsanguinée. Le thymus a été trituré dans un volume minimal de RPMIc. Les cellules ont été lavées et ensuite incubées 30 min à 4°C avec un surnageant de culture concentré 5 fois du clone J11D produisant une IgM de rat anti-CD24 (ATCC). Une incubation de 60 min à 37°C en présence de complément de lapin dilué 1/10 (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) a suivi. Cette étape a permis la déplétion des thymocytes immatures qui sont caractérisés par un niveau élevé de CD24. Les cellules ont été resuspendues dans 5 ml de RPMIc, puis les cellules mortes ont été enlevées par une centrifugation avec 5 ml de milieu lympholyte M (Cedarlane) à 20°C, 1300 x g durant 20 min. Les cellules vivantes (représentant environ 3 à 5% du nombre de départ) se logent à l'interface. Elles ont été prélevées puis lavées deux fois dans du RPMIc.

## **2.4 Foie**

La méthode d'enrichissement utilisée est celle décrite par Takeda et collaborateurs (1996). Le foie des souris sacrifiées a d'abord été perfusé avec du PBS, prélevé et trituré sur une grille en acier inoxydable. La suspension a été lavée et le culot resuspendu dans une solution contenant 30% de Percoll (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada) dans du HBSS (Hank's balanced salt solution; Gibco) additionné de 100 U/ml d'héparine (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, Ontario, Canada). Le tout a été centrifugé à 800 x g durant 10 min à la température de la pièce; les leucocytes se sont alors retrouvés dans le culot. Après élimination des érythrocytes par choc osmotique, les leucocytes ont été resuspendus dans du RPMIc.

## **2.5 Cavité péritonéale**

Les souris ont d'abord été injectées dans la cavité péritonéale avec 1,5 ml de thioglycollate 3% stérile (Sigma). Les souris ont été sacrifiées et exsanguinées à différents temps post-inoculation. Les cellules péritonéales ont été prélevées en injectant 10 ml de PBS (Gibco) contenant de l'acide éthylène diamine tétraacétique 5 mM (EDTA; Sigma) dans la cavité péritonéale et en réaspirant la solution injectée. Dans les cas où il y avait présence d'érythrocytes, ceux-ci ont été éliminés par choc osmotique. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans du RPMIc.

## **3. Lignées cellulaires**

Différentes lignées de cellules ont été utilisées dans ce projet. La lignée P815 (ATCC) utilisée dans les tests de cytotoxicité est un mastocytome provenant de la souris DBA/2. La lignée EL4 (ATCC) a aussi servi lors des tests de cytotoxicité. C'est un lymphome de cellules T provenant de la souris C57BL/6. La troisième lignée utilisée dans ces tests est C1498 (ATCC), initialement classifiée comme étant un myélome de souris C57BL/6, mais qui a récemment été décrite comme un lymphome de cellule NKT DN avec des caractéristiques atypiques de la lignée myéloïde (Labelle et Truitt, 2002). Ces

lignées cellulaires ont été cultivées dans du RPMIc additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF; Gibco) et maintenues à environ  $3 \text{ à } 5 \times 10^5$  cellules/ml.

Les cellules RAW264.7 (ATCC) et J774A.1 (ATCC), généreusement données par le Dr Albert Descoteaux (INRS-Institut Armand-Frappier), sont des lignées tumorales de cellules monocytes/macrophages issues de la souris BALB/c. Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM high glucose avec L-glutamine supplémenté avec 100 U/ml de pénicilline, 100  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine et d'HEPES 25 mM (DMEMc). Le milieu de culture contenait aussi 10% de SVF. Tous les suppléments provenaient de Gibco, sauf l'HEPES qui provient de Fisher.

La lignée cellulaire Jurkat J77.6 (JWT) (donnée par la Dre Pascale Duplay, INRS-Institut Armand-Frappier) a été utilisée pour différentes analyses concernant le récepteur Ly49B. Nous avons aussi utilisé ces mêmes cellules transfectées avec l'ADNc de Ly49A (JA), Ly49C (JC) (Chalifour *et al.*, 2003) ou Ly49B (JB) (Lévesque, 2002). Les cellules parentales JWT ont été cultivées dans du RPMIc 10% SVF tandis que pour les cellules transfectées, de la puromycine (Sigma) a été ajouté à ce milieu à une concentration de 1 ng/ml.

## **4. Cytométrie en flux**

### **4.1. Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux**

Les anticorps qui ont servi pour la cytométrie en flux sont présentés dans le tableau I. Les fluorochromes associés aux anticorps sont l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), la phycoérythrine (PE) et la biotine qui sera révélée avec le conjugué Streptavidine-Cy-Chrome™ (BD Pharmingen, Mississauga, Ontario, Canada).

### **4.2. Méthode d'analyse par cytométrie en flux**

Pour les marquages cellulaires, le milieu utilisé est du PBS sans calcium ni magnésium (Gibco), contenant 1% de SVF et 0,2% d'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ; Fisher). Les

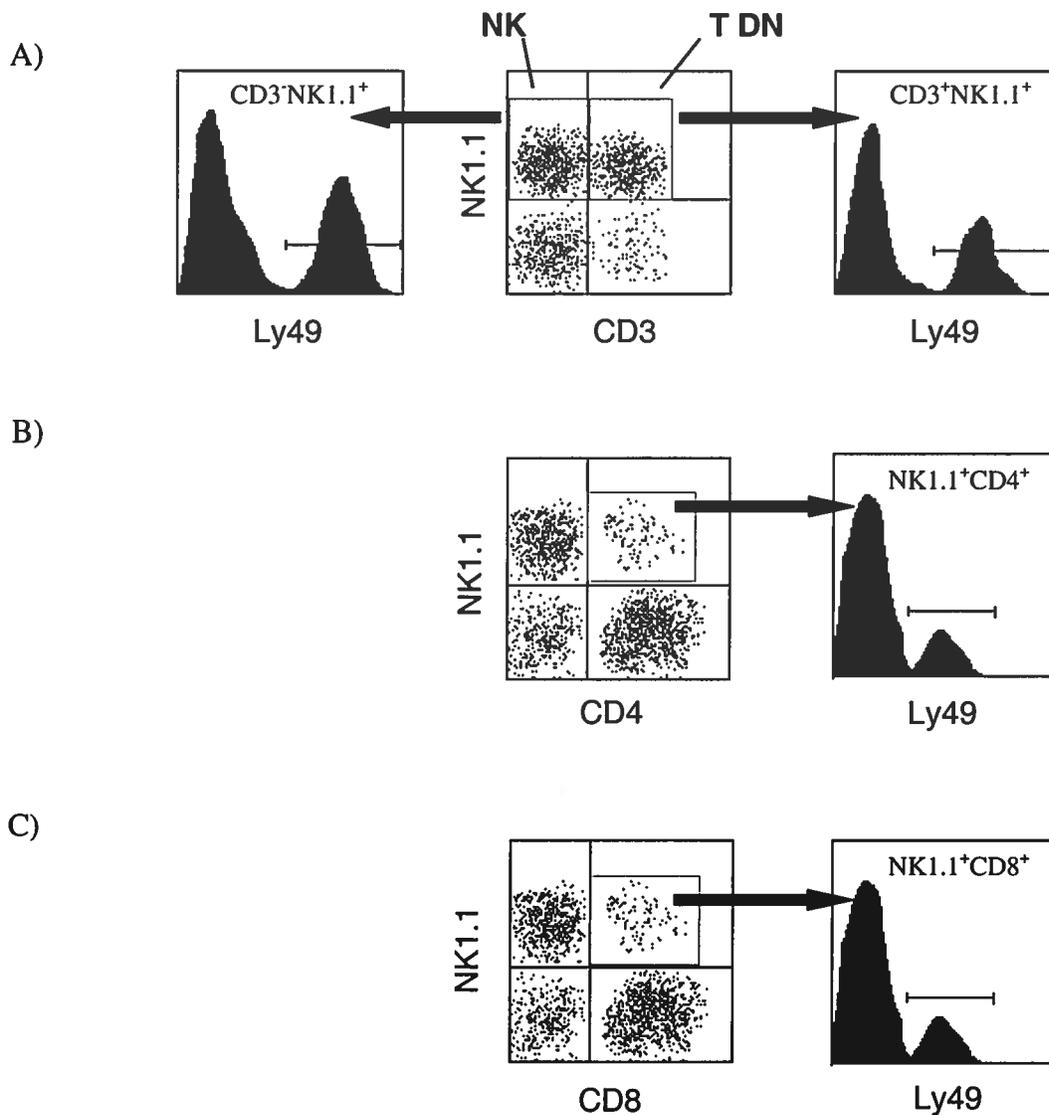
**Tableau I. Liste et caractéristiques des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux**

Anticorps	Isotype	Spécificité	Source
YE1/32	IgG2b de rat	Ly49A	F. Takei
3LP218	IgG de rat	Ly49B	S. Lemieux
4LO3311	IgG3 de souris	Ly49C	S. Lemieux
5GA5	IgG de hamster	Ly49C/I	S. Lemieux
4LO439	IgG3 de souris	Ly49G2	S. Lemieux
4D11	IgG2a de rat	Ly49G2/A	ATCC
145-2C11	IgG de hamster	CD3 $\epsilon$	ATCC
RM4-5	IgG2a de rat	CD4	BD Pharmingen
53-6.7	IgG2a de rat	CD8 $\alpha$	BD Pharmingen
PK136	IgG2a de souris	NK1.1	BD Pharmingen
DX5	IgM de souris	CD49b	BD Pharmingen
M1/70	IgG2b de rat	CD11b (Mac-1)	BD Pharmingen
RB6-8C5	IgG2b de rat	Ly6G (Gr-1)	eBioscience
F4/80	IgG2b de rat	macrophages	ATCC
RA3-6B2	IgG2a de rat	CD45R (B220)	BD Pharmingen
1D3	IgG2a de rat	CD19	BD Pharmingen
TM- $\beta$ 1	IgG2b de rat	CD122 (IL-2/IL-15R $\beta$ )	BD Pharmingen
53-7.3	IgG2a de rat	CD5	eBioscience
ACK4	IgG2a de rat	CD117 (c-kit)	Cedarlane

cellules ont été suspendues à  $4 \times 10^5$  cellules par tube. Les récepteurs Fc $\gamma$ RII et Fc $\gamma$ RIII ont d'abord été bloqués avec l'anticorps 2.4G2 (ATCC). Un  $\mu$ g par tube a été utilisé pour les lymphocytes et 15  $\mu$ g par tube pour les macrophages/granulocytes. Le blocage s'est fait à 4°C durant 20 min. Ensuite, le premier anticorps couplé à un fluorochrome a été ajouté à la suspension. Dans le cas des marquages avec un seul anticorps couplé au FITC ou à la PE, les échantillons ont été incubés 20 min à 4°C. Après un lavage, les cellules ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde 1% dans du PBS. Si l'anticorps utilisé était biotinylé, le conjugué Streptavidine-Cy-Chrome™ a été ajouté aux cellules et les échantillons ont été incubés 30 min de plus à 4°C. Ensuite les cellules ont été lavées et fixées. Dans le cas des doubles ou triples marquages, le deuxième anticorps a été ajouté 10 min après le premier anticorps et l'incubation s'est poursuivie pour 20 min additionnelles, toujours à 4°C. Ensuite, après un lavage, le troisième anticorps a été ajouté et les échantillons ont été incubés 20 min de plus, toujours à 4°C. Les cellules ont par la suite été lavées, le conjugué Streptavidine-Cy-Chrome™ ajouté et l'incubation s'est poursuivie 30 min à 4°C. Les cellules ont finalement été lavées et fixées dans une solution de paraformaldéhyde 1%. Le premier anticorps ajouté était toujours celui couplé au FITC, ensuite celui à la PE et en dernier l'anticorps biotinylé. Les analyses des échantillons ont été faites à l'aide d'un cytofluoromètre Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter Inc., Mississauga, Ontario, Canada) muni d'un laser à l'argon émettant à une longueur d'onde de 488 nm. Les données recueillies correspondent à l'analyse de 10 000 à 100 000 événements selon l'expérience. Deux logiciels d'acquisition de données ont été utilisés, soit System II et Expo 32 (Beckman Coulter Inc.). Le logiciel utilisé pour l'analyse des résultats est WinMDI (J. Trotter). Un exemple de la méthode d'analyse des différentes populations étudiées dans les suspensions contenant des cellules NK et des lymphocytes T est présenté à la figure 3.

## 5. Cultures cellulaires

Les populations de lymphocytes isolées à partir de la rate ont été cultivées dans du RPMIc additionné de 20 % de SVF et de  $\beta$ -2-mercaptoethanol ( $\beta$ -2ME; Sigma) 50 mM et maintenues à  $1 \times 10^6$  cellules/ml en ajoutant du milieu de culture et des cytokines.



**Figure 3. Représentation schématique de l'analyse par cytométrie en flux permettant la comparaison de l'expression des récepteurs Ly49 par les différentes sous-populations de lymphocytes T et de cellules NK.**

A) Après déplétion des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon ont été incubées avec l'anticorps 145-2C11 (anti-CD3 $\epsilon$ ) conjugué au FITC, l'anticorps PK136 (anti-NK1.1) conjugué à la PE et à un anticorps biotinylé spécifique à un récepteur Ly49 (Tableau 1). L'expression des récepteurs Ly49 est déterminée sur les cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> (cellules NK) et CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> (lymphocytes T NK1.1<sup>+</sup> DN). B) Après déplétion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, les cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon ont été incubées avec l'anticorps PK136 conjugué au FITC, l'anticorps RMA4-5 (anti-CD4) conjugué à la PE et avec un anti-Ly49 biotinylé. L'expression des récepteurs Ly49 a été évaluée sur les cellules NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. C) La même méthode d'analyse de l'expression des récepteurs Ly49 a été utilisée pour les cellules NK1.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sauf que les anticorps utilisés étaient 53-6.7 (anti-CD8) conjugué au FITC, PK136-PE et un anti-Ly49 biotinylé. Bien entendu, les cellules CD4<sup>+</sup> avaient préalablement été enlevées de la suspension cellulaire.

Différentes cytokines recombinantes de souris ont été ajoutées aux cultures dans les conditions suivantes: l'interleukine-2 (IL-2; Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada) a été utilisée à une concentration de 100 U/ml (50 ng/ml), l'IL-12 à 20 ng/ml (Cedarlane) et l'IL-15 à 300 ng/ml (Cedarlane). Toutes ces cytokines sont des interleukines recombinantes de souris. Pour les cultures avec l'IL-12, les cellules ont d'abord été cultivées 5 jours avec de l'IL-2. L'IL-12 a été ajoutée 2 heures après que l'IL-2 ait été enlevée suite à une centrifugation, la culture a été poursuivie pour 24 heures.

## **6. Production d'un anticorps monoclonal anti-Ly49B**

### **6.1. Clonage d'hybridomes**

L'hybridome 6G5 a été obtenu suite à la fusion de splénocytes d'un rat F-344 avec les cellules myélomateuses P3X63Ag8.653 (Lévesque 2002). Le rat avait préalablement été immunisé avec des cellules Jurkat transfectées avec l'ADNc du récepteur Ly49B. L'hybridome 6G5 semblant produire un anticorps réagissant avec le récepteur Ly49B, nous l'avons donc recloné à deux reprises par dilution limite.

Le milieu utilisé pour le clonage d'hybridomes est du DMEM high glucose avec L-glutamine supplémenté de  $\beta$ -2ME 50  $\mu$ M, 100 U/ml de pénicilline, 100  $\mu$ g/ml de streptomycine, 1% d'acides aminés non-essentiels, 1% de fongizone, d'HEPES 10 mM, de pyruvate 1 mM et 20% de SVF (tous les suppléments proviennent de Gibco ou Fisher). Les hybridomes ont été incubés en présence de cellules nourricières 3T3 irradiées dans des plaques de 96 puits. Chaque puits contenait environ  $2 \times 10^4$  cellules 3T3 incubées 18 heures à 37°C avant d'y ajouter les hybridomes à des concentrations prédéterminées de 10, 5, 3, et 0,3 cellules par puits. La croissance de clones a été vérifiée quotidiennement au microscope à compter du 7<sup>e</sup> jour de culture. La présence d'anticorps anti-Ly49B dans les surnageants des puits ne contenant qu'un seul clone visible a été testé par cytométrie en flux selon une méthode similaire à celle décrite par Smith et collaborateurs (Smith *et al.*, 2000). Un mélange de cellules contenant 50% de cellules JWT et 50% de cellules JB a été incubé avec les différents surnageants. La présence d'anticorps dans le surnageant a été révélée par l'ajout d'anticorps spécifiques à la portion Fc $\gamma$  des IgG de rat conjugués au

FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Les surnageants marquant 50% du mélange de cellules étaient considérés positifs pour la présence d'anticorps anti-Ly49B. Les clones avec la meilleure croissance et produisant un anticorps avec une forte intensité de fluorescence en cytométrie ont été sélectionnés et reclonés 2 autres fois. Le milieu de culture a alors été changé pour du RPMIc 10% SVF puisqu'il permettait une meilleure croissance des cellules.

## **6.2. Purification de l'anticorps 3LP218**

L'hybridome 6G51C82A8 sécrétant un anticorps monoclonal anti-Ly49B que nous avons nommé 3LP218 a été cultivé dans du milieu RPMIc 10% SVF jusqu'à environ deux litres de milieu. Les cellules ont alors été laissées à l'incubateur sans ajout de milieu frais jusqu'à ce que la viabilité cellulaire baisse à 20%, soit environ 7 jours après le dernier ajout de RPMIc 10% SVF. À ce moment, le surnageant de culture a été récolté après une centrifugation de 20 min, à 6300 x g à 4°C. Le surnageant de culture a été concentré environ 15 fois avec un système Amicon en utilisant une membrane 100K (les pores permettent le passage des protéines dont la masse moléculaire est inférieure à 100 kDa) (Filtron Technology Corporation, Northborough, MA, USA). L'anticorps a été purifié sur une colonne de protéine G Sepharose™ 4 Fast Flow (PGS; Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Les immunoglobulines ont ensuite été éluées avec un tampon d'éluion ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  0,5 M à pH 3,0) et le pH a été réajusté à environ 7,0 avec une solution de tris-HCl 1 M à pH 8,8. La solution d'anticorps a ensuite été concentrée avec le système Amicon sur une membrane 50K et dialysée dans du PBS à pH 7,4 (si l'anticorps n'avait pas à être couplé à un fluorochrome) ou dans le tampon adéquat pour la biotinylation ou le couplage au FITC. La concentration de la solution d'anticorps a finalement été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant la densité optique de la solution à une longueur d'onde de 280 nm. Sachant qu'à cette longueur d'onde, une densité optique de 1,4 équivaut à 1 mg d'immunoglobuline par ml, la concentration de l'anticorps a pu être calculée.

### 6.3. Biotinylation des anticorps

La solution d'anticorps a tout d'abord été dialysée contre une solution de carbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$  0,1 M à pH 8,0-8,3). La concentration de l'anticorps a ensuite été ajustée à 1 mg/ml. L'ester de biotine (N-hydroxysuccinimidobiotine; Sigma) a été dissout à 1 mg/ml dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO; Fisher). Pour chaque ml de la solution d'anticorps, 120  $\mu\text{l}$  de cette solution de biotine ont été ajoutés et le tout a été incubé une à deux h à la température de la pièce et à l'obscurité. Pour terminer, l'anticorps a été dialysé contre un tampon PBS à pH 7.4 pendant 24 h en changeant le tampon à plusieurs reprises pour éliminer la biotine libre. Pour la conservation, 0,1% d'azide de sodium a été ajouté à la solution. Finalement, la concentration de l'échantillon a été déterminée avec un spectrophotomètre tel que décrit précédemment.

### 6.4. Couplage des anticorps au FITC

La méthode utilisée est celle décrite par Goding (Goding, 1986). La solution d'anticorps purifié a d'abord été dialysée contre un tampon carbonate-bicarbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,08 M + de  $\text{NaHCO}_3$  0,2 M à pH 9,5). La quantité de FITC (Sigma) à utiliser dépend de la concentration de l'anticorps. Le FITC a été dissout dans du DMSO à une concentration de 1 ou 10 mg/ml et le volume nécessaire a été ajouté goutte à goutte sous légère agitation à la solution d'anticorps. Après 2 h d'incubation dans l'obscurité et à la température de la pièce, les protéines conjuguées ont été séparées du FITC libre par filtration sur une colonne PD-10 contenant du Sephadex<sup>®</sup> G-25 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) en suivant les recommandations du fabricant. Le tampon utilisé était du PBS. La concentration en protéines (mg/ml) a été calculée avec la formule suivante :  $(\text{DO}_{280} - (\text{DO}_{492} \times 0,35)) / 1,4$ . Pour la conservation de l'anticorps, 0,1% d'azide de sodium a été ajouté à la solution.

## 7. Immunoprécipitation

La technique d'immunoprécipitation utilisée a été inspirée de celle décrite dans *Current Protocols in Immunology* (Sections 8.3 et 8.16). Tout d'abord, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS avec  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,9 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM, NaCl 154 mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM à pH 7,2-7,4) pour enlever les protéines présentes dans le sérum et dans le milieu de culture. Le culot cellulaire a ensuite été repris dans la solution de NHS-biotine (Sulfo-N-Hydroxysuccinimidobiotine) (0,5 mg/ml dans du PBS avec  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ; 1 ml/1 x 10<sup>7</sup> cellules) (MJS Biolynx Inc., Brockville, Ontario, Canada). Après une incubation de 40 min sur glace avec agitation manuelle aux 5 min, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS. Les cellules biotinyllées ont été transférées dans un microtube et incubées 60 min sur glace en présence du tampon de lyse (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 0,5% (NP-40; Sigma) à pH 8,2); juste avant utilisation, du fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF; Sigma) pour une concentration finale de 1mM et de la BSA pour une concentration finale de 1% ont été ajoutées au tampon de lyse. Les lysats cellulaires ont été centrifugés dans une micro-centrifugeuse durant 10 min à la vitesse maximale à 4°C. Le surnageant contenant les protéines extracellulaires biotinyllées et les protéines intracellulaires non biotinyllées a été prélevé. Les lysats cellulaires ont ensuite été clarifiés avec une ou deux incubations rotatives d'une heure à 4°C en présence de 20  $\mu\text{l}$  (volume sec) de PGS pour 1 x 10<sup>7</sup> cellules. Les tubes ont été centrifugés et les surnageants ont ensuite été récoltés et incubés en présence de 30  $\mu\text{l}$  de PGS pour 1 x 10<sup>7</sup> cellules préalablement couplée à l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation. Le tout a été incubé sous agitation rotative une nuit à 4°C. Dans certaines conditions, les lysats cellulaires ont été préimmunoprécipités durant 2 h avec la PGS couplée à un mélange d'anticorps monoclonaux anti-CD16/32 clone 2.4G2, anti-CD8 clone 53-6.72 (ATCC) et un anticorps polyclonal anti-CD64 (Fc $\gamma$ RI) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) ce qui permettait de réduire la non spécificité. Le lendemain, les tubes ont été centrifugés dans une micro-centrifugeuse une min à la vitesse maximale à 4°C et les surnageants ont été aspirés et jetés. Les culots ont été lavés 4 fois avec le tampon de lyse contenant du PMSF et de la BSA, toujours à 4°C. Finalement 2 autres lavages ont été effectués avec le tampon de lyse sans BSA. Ensuite le

tampon d'échantillon (avec ou sans  $\beta$ -2ME comme agent réducteur) a été ajouté au culot et les échantillons ont été bouillis 5 min puis congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE).

### **8. Stimulation des cellules au pervanadate**

Une façon de prouver le potentiel inhibiteur d'un récepteur est de démontrer que les tyrosines de ses ITIM peuvent être phosphorylées et que celles-ci permettent alors l'association à une protéine phosphatase. Le pervanadate est un inhibiteur de protéines tyrosine phosphatase. Le traitement des cellules avec le pervanadate induit donc la phosphorylation optimale des résidus tyrosines (O'Shea *et al.*, 1992). Pour ce faire, les cellules ont d'abord été lavées 3 fois avec du HBSS et réparties dans des microtubes à raison de  $1 \times 10^7$  cellules par tube. Le culot a été resuspendu dans  $100 \mu\text{l}$  de HBSS (Gibco) contenant du pervanadate  $1\text{mM}$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,03\%$  et de l'orthovanadate de sodium  $1 \text{mM}$  ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Sigma). Les témoins négatifs ont été resuspendus dans du HBSS seulement. Les cellules ont été incubées  $15 \text{min}$  à  $37^{\circ}\text{C}$  sur bloc chauffant. La stimulation a été arrêtée par l'ajout de  $500 \mu\text{l}$  de tampon de lyse contenant du  $\text{MgCl}_2$   $1 \text{mM}$ , du EGTA  $1 \text{mM}$  (ethyleneGlycol- $\beta$ -aminoethyl ether-tetraacetic acid), du NaF  $50 \text{mM}$ , du  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$   $1 \text{mM}$ , du  $\text{Na}_3\text{VO}_4$   $1 \text{mM}$  (provenant tous de Sigma), du Pefabloc SC  $1 \text{mM}$ , de l'Aprotinin  $10 \mu\text{g/ml}$ , de la Leupeptin  $10 \mu\text{g/ml}$ , de la Pepstatin  $1 \mu\text{g/ml}$  (Roche Diagnostics) dans du tampon Tris-HCl  $20 \text{mM}$  à pH  $7,5$  contenant du NaCl  $150 \text{mM}$  et du NP-40  $1\%$ . Les tubes ont été incubés sur glace durant  $30 \text{min}$  et ensuite ils ont été centrifugés dans une micro-centrifugeuse durant  $10 \text{min}$  à la vitesse maximale à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les surnageants ont été récoltés et les différents récepteurs Ly49 ont été immunoprécipités tel que décrit dans la section précédente.

### **9. Immunobuvardage de type western**

Les différents échantillons obtenus lors des immunoprécipitations ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide  $10$  ou  $12\%$  (SDS-PAGE). Ensuite, les

protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond™ECL™, Amersham Pharmacia Biotech Inc.) avec un appareil TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) et visualisées par une coloration non permanente au rouge Ponceau, ce qui a permis de vérifier la qualité du transfert. Les protéines ont ensuite été décolorées par trempages successifs dans le tampon TBS-tween (Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, tween 20 0,5% à pH 7,2). La membrane a ensuite été incubée dans la solution de blocage (TBS-tween + BSA 5%) durant une nuit à 4°C avec agitation.

Pour la mise en évidence de protéines biotinylées immunoprécipitées par l'anticorps, la membrane a ensuite été lavée et réincubée 60 min à la température de la pièce avec la solution de blocage additionnée du conjugué streptavidine-Horseradish peroxidase (SA-HRP; Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Après cette incubation la membrane a été relavée et finalement incubée 5 min à la température de la pièce avec les réactifs de chimio-luminescence ECL Plus™ (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Les bandes protéiques présentes sur la membrane ont ensuite été visualisées en exposant un film Konica sur la membrane. Le film a été développé à l'aide d'un développeur automatique (Mini-med/90 X-ray film processor; AFP imaging corp., Elmsford, NY, USA).

Dans le cas des analyses pour la phosphorylation sur tyrosine et le recrutement de la phosphatase SHP-1 par les récepteurs Ly49, la membrane a été lavée après le blocage et incubée 60 min à la température de la pièce avec la solution de blocage additionnée d'un anticorps anti-phosphotyrosine (IgG2b de souris monoclonales, clone 4G10; Upstate, Lake Placid, NY, USA) ou avec un anticorps anti-SHP-1 (IgG de lapin polyclonales; Santa Cruz Biotechnology Inc.). La membrane a ensuite été lavée 4 fois avec du TBS-tween et réincubée durant 60 min avec une solution de TBS-tween 5% BSA contenant un deuxième anticorps couplé à la HRP (solutions d'anticorps polyclonaux purifiés anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin; Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Les bandes présentes sur la membrane ont ensuite été visualisées avec la technique de chimio-luminescence décrite précédemment.

## 10. Tests d'inhibition de l'activité fonctionnelle par le récepteur Ly49B

Nous avons tenté d'inhiber, via le récepteur Ly49B, trois fonctions cellulaires importantes dans l'activité fonctionnelle des macrophages. Pour l'engagement du récepteur Ly49B, nous avons utilisé l'anticorps 3LP218 suivi d'un deuxième anticorps reconnaissant les IgG de rat. Pour déterminer les quantités d'anticorps à utiliser, nous nous sommes basés sur les tests d'inhibition par le récepteur PIR-B (Bléry *et al.*, 1998; Uehara *et al.*, 2001).

### 10.1. Dosage de l'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO) relâché par une cellule peut être mesuré à l'aide de la réaction de Griess (Green *et al.*, 1990; Funatogawa *et al.*, 1998). Le test mesure la présence de nitrate qui est un produit stable du métabolisme du NO. Nous avons vérifié si la production de NO pouvait être inhibée via le récepteur Ly49B. Pour ce faire, la veille du test,  $2,5 \times 10^5$  cellules de la lignée RAW264.7 ont été distribuées dans les puits d'une plaque de 24 puits, dans un volume de 500  $\mu$ l de DMEMc 10 % SVF. La plaque a été incubée à 37°C pour la nuit. Le lendemain, le milieu a été aspiré et l'anticorps 3LP218 a été ajouté aux cellules à diverses concentrations dans du DMEMc 1% SVF. Dans les puits témoins, le milieu ajouté ne contenait pas d'anticorps. La plaque a été incubée durant 45 min à 4°C. Ensuite, le milieu a été aspiré, les puits ont été lavés et un deuxième anticorps de chèvre anti-IgG de rat a été ajouté encore une fois dans du DMEMc 1% SVF. Le tout a été incubé durant 45 min à 37°C. Une fois l'incubation terminée, les puits ont été relavés et 1 ml de DMEMc 10% SVF contenant 10 ou 100 ng de LPS a été ajouté aux cellules. La plaque a été réincubée à 37°C pour une période d'environ 18 h. Ensuite, 50  $\mu$ l de surnageant de chaque puits a été transféré dans une plaque de 96 puits. Les réactifs de Griess ont ensuite été ajoutés (100  $\mu$ l chacun). Le réactif # 1 est une solution de sulfanilamide 1% (Sigma) et d'acide phosphorique 2,5% (Fisher) tandis que le réactif # 2 est du N-(1-naphtyl)éthylènediamine 0,1% (Sigma). Le tout a été incubé 30 min à l'obscurité à la température de la pièce. Finalement la densité optique des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde de 540 nm ( $DO_{540}$ ) à l'aide d'un lecteur de plaque

ELISA (Microplate autoreader EL309; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). La concentration de nitrate relâché par les cellules a pu être évaluée par une comparaison des  $DO_{540}$  obtenues avec les valeurs d'une courbe standard de  $NaNO_2$ .

## 10.2. Phagocytose de billes

Le protocole que nous avons utilisé pour les tests de phagocytose a été adapté de techniques déjà décrites (Oda et Maeda, 1986; Stewart *et al.*, 1986). Les cellules utilisées pour ces tests sont les monocytes/macrophages de la lignée RAW264.7. Les tests ont été effectués dans des plaques de 6 puits. Pour que les cellules adhèrent bien au fond des puits, elles ont été mises dans les puits la veille du test ( $1 \times 10^6$  cellules/puits) dans 4 ml de DMEMc 10% SVF et incubées à 37°C. Le lendemain le nombre de cellules par puits était environ  $2 \times 10^6$ . Le milieu a été aspiré et remplacé par 2 ml de DMEMc 1% SVF contenant 25  $\mu$ g de l'anticorps monoclonal anti-Ly49B 3LP218. Les plaques ont été incubées 45 min à 4°C. Après avoir aspiré le milieu contenant le premier anticorps et fait un lavage avec du DMEMc, un deuxième anticorps de chèvre reconnaissant les IgG de rat a été ajouté dans un volume de 2 ml DMEMc 1% SVF à une concentration de 100  $\mu$ g/puits. Dans le cas des témoins, le même volume de milieu sans anticorps a été ajouté aux puits. Les plaques ont été incubées 45 min à 37°C. Le milieu a ensuite été aspiré et les cellules ont été lavées une fois. Ensuite, 2 ml d'une suspension de billes "Fluoresbrite™ YG Carboxylate Microspheres 1.75  $\mu$ " (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) ont été ajoutés dans les puits. Différentes concentrations de billes ont été utilisées variant de 25 à 70 billes par cellule. Les cellules ont été incubées en présence des billes de 30 à 120 min à 37°C (4°C dans le cas des témoins négatifs). Une fois l'incubation terminée, le milieu contenant les billes a été aspiré et les plaques ont été lavées 3 fois avec 3 ml de DMEMc froid sous agitation à 4°C durant 5 min par lavage. Un quatrième lavage a été fait dans les mêmes conditions avec du PBS. Les cellules ont ensuite été récoltées en aspirant et en expulsant fortement du PBS sur les cellules à l'aide d'une pipette pasteur. Elles ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans du PBS 1% paraformaldéhyde. Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux.

### 10.3. Cytotoxicité dépendante d'anticorps (ADCC)

Le but de ces tests était de voir si la lyse d'une cellule cible par une cellule effectrice exprimant le récepteur Ly49B pouvait être inhibée lors de l'engagement de ce récepteur par l'anticorps 3LP218. Les cellules effectrices étaient activées via leurs récepteurs Fc $\gamma$  par les cellules cibles recouvertes d'anticorps. Plusieurs combinaisons de cellules cibles et effectrices ont été utilisées. Les cellules ayant servi de cibles provenaient des lignées P815, EL4 et C1498 tandis que les cellules effectrices étaient les cellules de la cavité péritonéale de souris stimulées 4 h au thioglycollate 3% ainsi que les macrophages des lignées RAW264.7 (Ralph et Nakoinz, 1977) et J774A.1 (Ralph et Nakoinz, 1975). Ces lignées ont parfois été pré-activées par différents agents stimulants dont l'IFN $\gamma$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), le lipopolysaccharide (LPS) de *Escherichia coli* souche O127:B8 (Sigma), l'IL-15 (Cedarlane) et l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly I:C; Sigma).

Les cellules cibles ont d'abord été marquées au chromate de sodium  $^{51}\text{CrO}_4$  (Na $_2$  $^{51}\text{CrO}_4$ ; ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA, USA) avec une dose variant de 100 à 200  $\mu\text{Ci}$  dans un volume de 10 ml. Le temps d'incubation des cellules a varié de 90 min à une nuit à 37°C. Une fois l'incubation terminée, les cellules ont été lavées à 4 reprises dans du RPMIc pour éliminer toute trace de radioélément non incorporé aux cellules. Ensuite l'anticorps réagissant contre les cellules cibles a été ajouté et l'incubation a duré 60 min à 4°C ou à 37°C. Les cellules cibles radiomarquées ont par la suite été distribuées dans les puits à fonds ronds d'une plaque de 96 puits, de façon à ce que chaque puits contienne toujours  $1 \times 10^4$  cellules cibles dans un volume de 100  $\mu\text{l}$  de RPMIc 10% SVF. Ensuite, les cellules effectrices ont été ajoutées aux puits à différentes concentrations dans le but d'avoir différents ratios cellules effectrices/cellules cibles. Chaque condition a été testée en triplicata ou en quadruplicata. Il est à noter que dans certaines expériences, les cellules effectrices ont préalablement été incubées avec l'anti-Ly49B (3LP218) et dans les cas où les cellules cibles n'exprimaient pas de récepteurs Fc $\gamma$ , un deuxième anticorps de chèvre anti-IgG de rat a été ajouté pour assurer le pontage (Bio Can Scientific, Mississauga, Ontario, Canada). Le volume final dans chaque puits était toujours de 200

$\mu$ l. Après l'addition des cellules effectrices, la plaque a été centrifugée durant une min dans le but de favoriser le contact entre les cellules. Elle a ensuite été incubée à 37°C pour une période variant de 6 à 24 h selon l'expérience, puis la plaque a été centrifugée à 500 x g durant 5 min. De chaque puits, 25  $\mu$ l de surnageant ont été prélevés et transférés dans une plaque de 96 puits pour compteur à scintillation liquide. Ensuite, 150  $\mu$ l de liquide à scintillation "OptiPhase SuperMix" (PerkinElmer Life Sciences Inc., Woodbridge, Ontario, Canada) ont été ajoutés à chaque puits. La plaque a été agitée durant 10 min et la radioactivité a été mesurée à l'aide d'un appareil MicroBeta® TriLux (PerkinElmer Life Sciences Inc.). Le pourcentage de cytotoxicité a été mesuré selon la formule suivante:

$$\% \text{ de cytotoxicité} = (\text{CPM (test)} - \text{CPM (rs)} / \text{CPM (rm)} - \text{CPM (rs)}) \times 100$$

CPM = Coups par minute

rs = relâchement spontané

rm = relâchement maximal

## 11. Analyses statistiques

Lorsque requis, les données sur l'expression des récepteurs Ly49 ont été analysées selon le test *t* de Student.

## IV. RÉSULTATS

### 1. Expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs par différentes populations lymphocytaires de la rate

Tel que mentionné dans la revue bibliographique, les récepteurs Ly49 inhibiteurs jouent un rôle déterminant dans la tolérance des cellules NK envers les cellules autologues. Leur capacité de se lier aux molécules du CMH-I leur confère la propriété de tenir en échec les programmes de cytotoxicité cellulaire et de sécrétion de cytokines des cellules NK. Ceci n'est toutefois possible qu'en autant que les récepteurs Ly49 sont exprimés à des taux suffisants sur les cellules NK et que les cellules avec lesquelles elles entrent en contact expriment des taux appropriés de molécules du CMH-I. Il est donc clair que la modulation des récepteurs Ly49 sur les cellules NK et des molécules du CMH-I sur les cellules environnantes joue un rôle déterminant dans le potentiel de signalisation de ces récepteurs. Une modulation à la baisse des récepteurs Ly49 ou de leurs ligands sur les cellules cibles risque de réduire en dessous de la valeur seuil le nombre d'interactions récepteurs/ligands, ce qui rendrait alors les cellules cibles vulnérables à l'activité cytotoxique des cellules NK. Cependant, cette situation ne s'applique que lorsque la cellule cible exprime à un niveau suffisant un ligand d'un récepteur d'activation présent sur la cellule NK. Ceci est généralement le cas en raison de la grande diversité de ces récepteurs et de l'expression relativement commune de leurs ligands.

L'expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs sur différentes sous-populations de lymphocytes T est inattendue. L'apparition de tels récepteurs sur des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ayant le phénotype de cellules mémoires suggère que l'expression *de novo* de tels récepteurs élève le seuil au dessus duquel ces cellules puissent être activées via leur TCR. En conséquence, plus le niveau des récepteurs Ly49 est élevé sur ces lymphocytes T, plus fort devra être le signal reçu via le TCR pour que la cellule soit activée.

Étant donné que les cellules NK et les lymphocytes T baignent dans un environnement cytokinique dont la composition varie au gré des agressions microbiennes

auxquelles l'organisme fait face ou des transformations néoplasiques qu'il subit, on peut faire l'hypothèse que le niveau d'expression des récepteurs Ly49 sur ces cellules puisse varier constamment. Peu de choses étant connues sur l'effet des cytokines sur la modulation des récepteurs Ly49, c'est à cette question que veut répondre le premier objectif de ce projet de maîtrise.

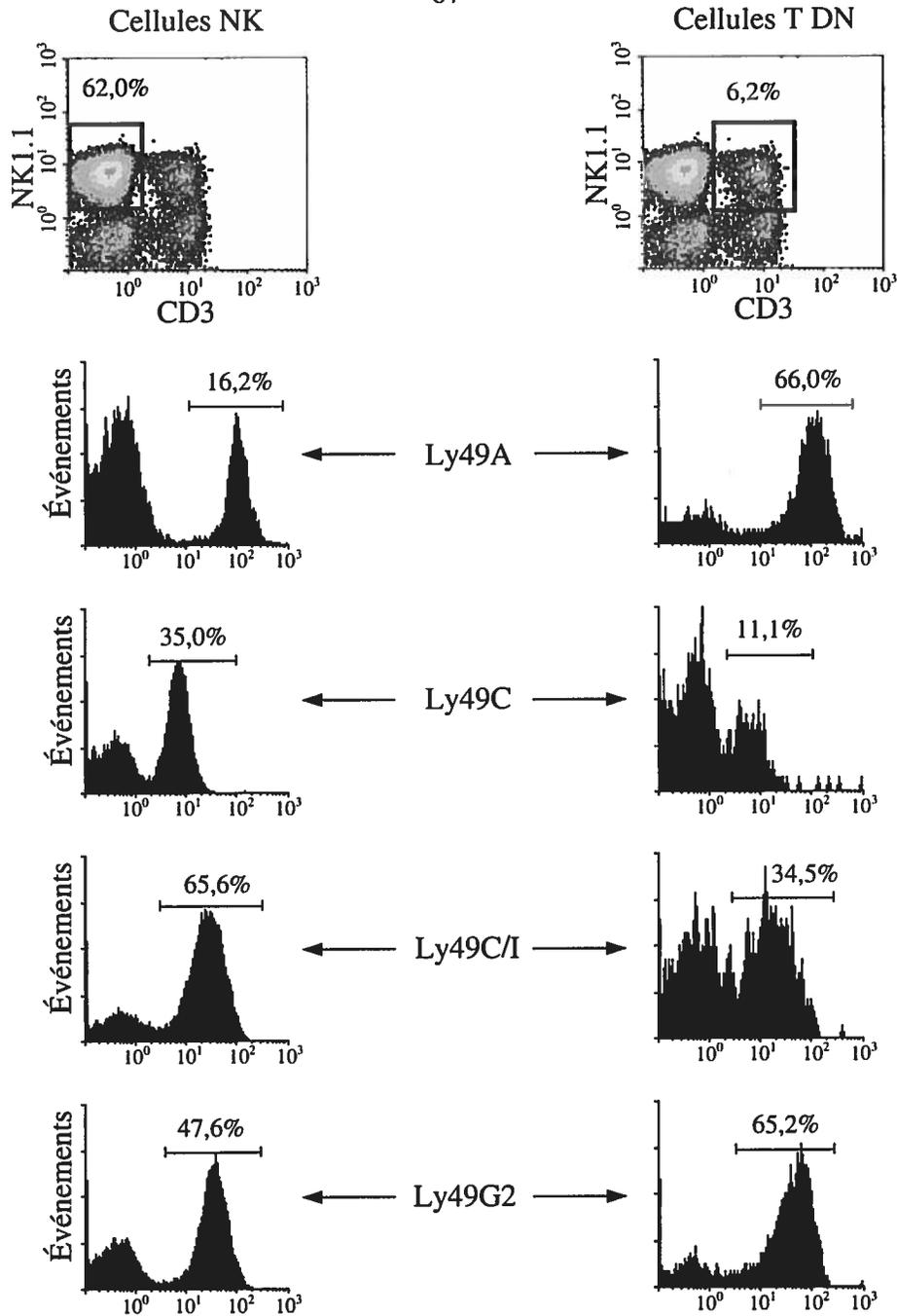
Chez la souris C57BL/6, 9 gènes codant des récepteurs Ly49 potentiellement inhibiteurs ont été rapportés à ce jour (*Ly49a, b, c, e, f, g, i, j et q*) (Anderson, Ortaldo et McVicar, 2001). Dans une étude ayant porté sur l'analyse individuelle de 80 cellules NK spléniques de souris C57BL/6 adultes, aucune trace d'ARNm n'a pu être décelée pour les récepteurs Ly49B, E et F ce qui les exclut comme intervenants majeurs dans la régulation des cellules NK (Takei *et al.*, 2001). D'autre part, aucune publication n'a encore rapporté l'expression du récepteur Ly49Q en surface cellulaire, aucun anticorps monoclonal n'étant disponible à cet effet. La régulation de l'activité fonctionnelle des cellules NK par des récepteurs Ly49 inhibiteurs chez la souris C57BL/6 serait donc surtout due à 5 récepteurs soit Ly49A, Ly49C, Ly49G, Ly49I et Ly49J. Notre laboratoire a déjà rapporté que le marquage des cellules NK spléniques de la souris C57BL/6 avec un mélange d'anticorps reconnaissant les récepteurs Ly49A, Ly49C, Ly49G2 et Ly49I identifiait 87% des cellules NK1.1<sup>+</sup> (DePATIE *et al.*, 1999). De même, la proportion de cellules dans lesquelles de l'ARNm d'au moins un de ces récepteurs a été détecté correspondait à 90% des cellules et aucune des 80 cellules testées n'exprimait le récepteur Ly49J en l'absence d'au moins un des récepteurs Ly49A, Ly49C, Ly49G ou Ly49I (Takei *et al.*, 2001). On peut conclure de ces observations que le suivi de l'expression de ces quatre récepteurs en surface cellulaire et l'analyse de leur modulation par différentes cytokines devrait permettre de tracer un portrait assez juste de la population globale.

Pour ce faire, nous avons utilisé les anticorps monoclonaux suivants: YE1/32, une IgG2b de rat anti-Ly49A (réactif gracieusement fourni par le Dr Fumio Takei, Terry Fox Laboratory and BC Cancer Research Center, Vancouver, BC, Canada), 4LO3311, une IgG3 de souris anti-Ly49C, 4LO439, aussi une IgG3 de souris spécifique de l'allèle exprimé chez la souris C57BL/6 du récepteur Ly49G2 et 5GA5, une IgG de hamster qui

reconnaît un épitope commun à Ly49C et Ly49I et qui nous permet donc d'inclure le récepteur Ly49I à notre étude. Les anticorps monoclonaux 4LO3311, 4LO439 et 5GA5 ont été développés dans notre laboratoire qui a aussi procédé à l'analyse de leur spécificité (Lemieux *et al.*, 1991; Paré, 1995; Gosselin *et al.*, 1997; Depatie *et al.*, 1999). Aucun anticorps monoclonal se liant exclusivement à Ly49I n'a pour l'instant été rapporté. Ce pourrait être le cas pour l'anticorps monoclonal YLI-90, mais sa non-réactivité avec le récepteur Ly49J n'a pas été établie (Coles *et al.*, 2000). Pour l'instant, le seul anticorps monoclonal qui se lie à Ly49J (8H7) réagit également avec Ly49I (McQueen *et al.*, 1999), une observation qui élimine d'emblée la possibilité de considérer aussi le récepteur Ly49J dans notre étude. À l'instar de 5GA5, tous les autres anticorps monoclonaux qui reconnaissent le récepteur Ly49I (SW5E6, 1F8, 8H7 et 14B11) se lient également à au moins un autre récepteur du groupe de récepteurs apparentés à Ly49C (groupe Ly49C-like) (Anderson, Ortaldo et McVicar, 2001).

Outre les cellules NK, nous avons aussi voulu suivre l'expression et la modulation des récepteurs Ly49 inhibiteurs sur trois sous-populations de lymphocytes T soit: les cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> DN, CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Les processus d'enrichissement utilisés pour obtenir ces sous-populations ont été décrits à la section 2.1 et les protocoles d'analyse à la section 4.2 du chapitre III. Les études ont été faites sur les cellules spléniques de la souris C57BL/6.

Après déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de la suspension de cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon, on récupère environ 3% des cellules spléniques (moyenne de 7 expériences) qui contiennent 61,6% ± 4,5% de cellules NK (CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>) et 7,1% ± 0,9% de cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> DN (Figure 4). Après déplétion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> uniquement on obtient seulement 0,3% ± 0,2% de cellules T CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> alors que la déplétion des lymphocytes CD4<sup>+</sup> permet le recouvrement de 0,6% ± 0,1% de cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (moyenne de 3 et 4 expériences respectivement, résultats non illustrés). Une expérience représentative de l'analyse de l'expression des récepteurs Ly49 sur les cellules CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup> et les cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> DN est illustrée dans la figure 4.



**Figure 4. Expression des récepteurs Ly49 par les cellules NK et les lymphocytes T DN spléniques de la souris C57BL/6.**

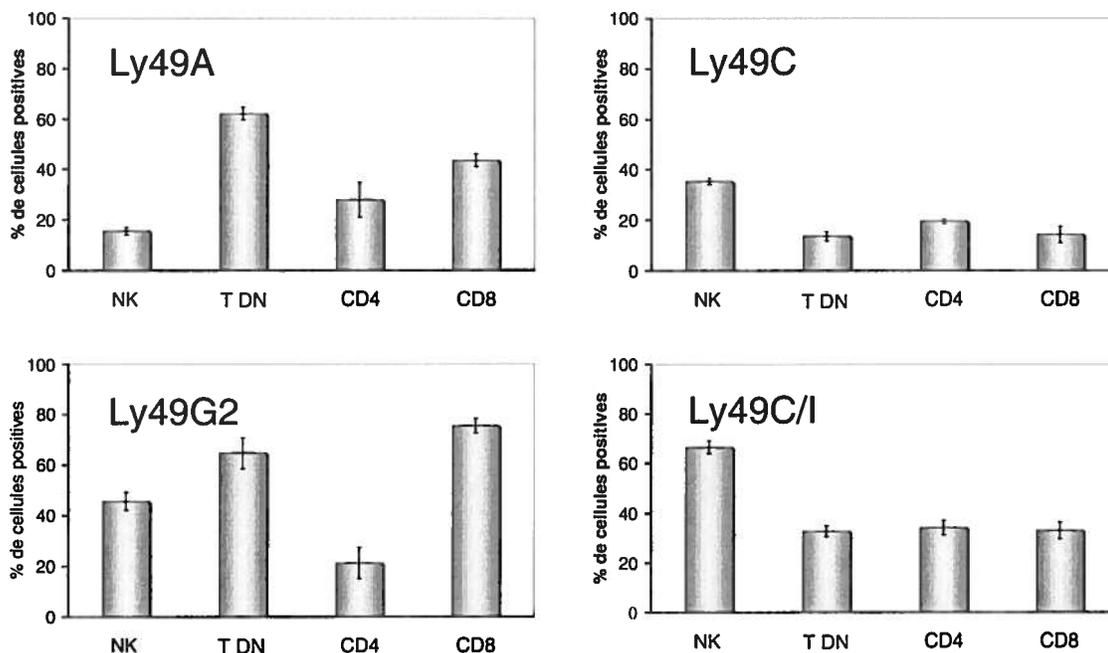
Après déplétion des cellules T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  des cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon, les cellules résiduelles ont été marquées avec les anticorps 145-2C11 couplé au FITC (anti-CD3), PK136 couplé à la PE (anti-NK1.1) ainsi qu'avec un anticorps anti-Ly49 biotinylé et révélé avec le conjugué Streptavidine-Cy-Chrome™. Les anticorps reconnaissant les récepteurs Ly49 utilisés sont YE1/32 (anti-Ly49A), 4LO3311 (anti-Ly49C), 5GA5 (anti-Ly49C/I), 4LO439 (anti-Ly49G2). L'expression des récepteurs Ly49 a été évaluée sur les cellules  $CD3^+NK1.1^+$  (cellules NK) ou  $CD3^+NK1.1^-$  (cellules T doubles négatives). Un minimum de 80 000 événements ont été analysés pour chaque marquage. Les résultats illustrés sont ceux d'une expérience représentative de 7 expériences similaires.

L'intensité de l'expression (MFI, "mean of fluorescence intensity") d'un récepteur peut être déduite à partir de la position du pic correspondant aux cellules positives sur un histogramme d'analyse par cytométrie en flux. Plus le récepteur est exprimé à la surface des cellules positives, plus le pic sera déplacé vers la droite sur l'histogramme et inversement, si l'intensité d'expression est faible, le pic sera alors déplacé vers la gauche, se rapprochant ainsi du pic des cellules n'exprimant pas le récepteur. Le récepteur dont l'intensité de l'expression est la plus faible parmi ceux qui ont été évalué est Ly49C (figure 4), ce qui concorde avec le fait que la souris C57BL/6 exprime H-2K<sup>b</sup>, un ligand de forte affinité pour ce récepteur. À l'opposé, les récepteurs Ly49A et Ly49G2 n'ont pas de ligand exprimé par cette souche de souris, ce qui se traduit par un niveau d'expression plus élevé (Figure 4).

Les récepteurs Ly49 ne sont pas exprimés uniformément par les différentes populations cellulaires NK1.1<sup>+</sup> (Figure 5). Les récepteurs Ly49A et Ly49G2 se retrouvent majoritairement sur les cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> DN et les cellules T CD8<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> tandis que les récepteurs Ly49C et Ly49I sont surtout exprimés par les cellules NK. La proportion de cellules exprimant un même récepteur Ly49 varie beaucoup selon la population cellulaire. Par exemple, moins de 20% des cellules NK expriment le récepteur Ly49A tandis que pour les cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> DN on détecte ce récepteur sur environ 60% de la population. L'expression des récepteurs Ly49 varie beaucoup parmi les sous-populations de lymphocyte T. Ainsi, le récepteur Ly49G2 est exprimé par une forte proportion des cellules T DN et par les cellules T CD8<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> (65 et 75% respectivement), tandis qu'à peine plus de 20% des cellules T CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> expriment ce récepteur. À l'opposé, une proportion semblable de ces trois sous-populations cellulaires expriment le récepteur Ly49C (moins de 20%) de même que l'épitope partagé les récepteurs Ly49C et Ly49I (environ 30%).

## **2. Modulation de l'expression des récepteurs Ly49 par des cytokines**

Nous avons ensuite évalué si la présence de cytokines dans le milieu de culture avait une influence sur la proportion des cellules exprimant les récepteurs Ly49 testés



**Figure 5. Expression des récepteurs Ly49 par différentes populations spléniques de lymphocytes exprimant le récepteur NK1.1.**

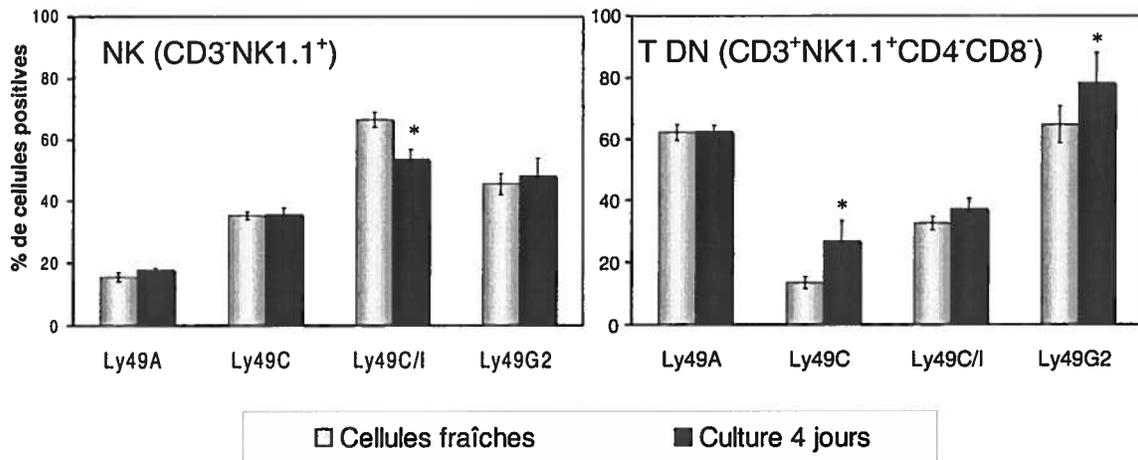
Les cellules NK ( $CD3^{-}NK1.1^{+}$ ) et les lymphocytes T DN ( $CD3^{+}NK1.1^{+}CD4^{-}CD8^{-}$ ) de la souris C57BL/6 ont été obtenus et l'expression des récepteurs Ly49 a été analysée tel que décrit à la figure 4. L'expression des récepteurs Ly49 par les lymphocytes T  $CD4^{+}NK1.1^{+}$  a été faite à partir d'une suspension de cellules non adhérentes à la laine de nylon après élimination des cellules  $CD8^{+}$ . Les marquages ont été faits avec les anticorps anti-NK1.1-FITC, anti-CD4-PE et anti-Ly49 biotinylé. Pour l'analyse des lymphocytes T  $CD8^{+}NK1.1^{+}$ , ce sont les cellules  $CD4^{+}$  qui ont été enlevées. Les anticorps utilisés sont un anti-CD8-FITC, un anti-NK1.1-PE et un anti-Ly49 biotinylé. Plus de 100 000 événements par échantillon ont été analysés pour les marquages des lymphocytes T  $CD4^{+}NK1.1^{+}$  et  $CD8^{+}NK1.1^{+}$ . Les résultats présentés sont la moyenne et l'écart type de 7 expériences pour les cellules NK et les lymphocytes T DN, de même que de 3 et 4 expériences respectivement pour les lymphocytes T  $CD4^{+}NK1.1^{+}$  et les T  $CD8^{+}NK1.1^{+}$ .

ainsi que sur les niveaux d'expression (MFI) de ces mêmes récepteurs. Nous avons évalué l'effet produit par les interleukines IL-2, IL-12 et IL-15 qui sont toutes des cytokines reconnues pour jouer un rôle dans l'activité fonctionnelle de ces cellules. Étant donné les très faibles quantités de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> recueillis lors des analyses précédentes, les expériences de modulation par les cytokines n'ont porté que sur les cellules NK et CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> DN.

### **2.1. Effet des cytokines sur l'expression des récepteurs Ly49 par les cellules NK spléniques et les lymphocytes T DN**

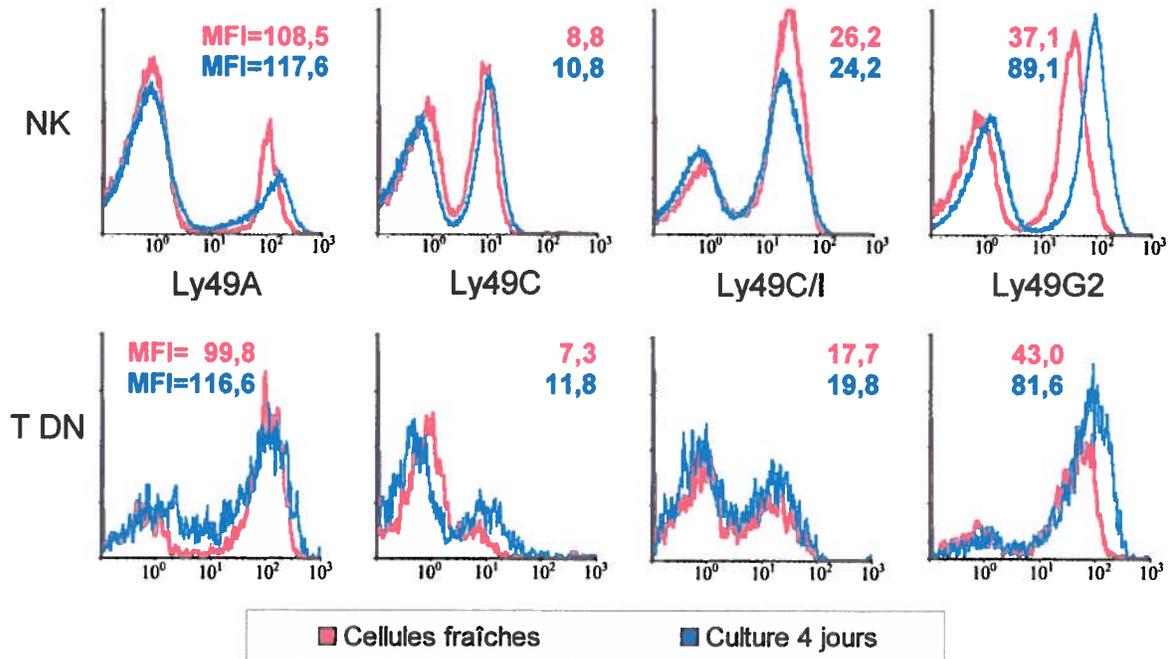
Les cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon et débarrassées des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (population composée majoritairement de cellules NK et de cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> DN) ont donné des résultats semblables lorsque cultivées quatre jours en présence d'IL-2 ou d'IL-15 (seuls les résultats obtenus dans les cultures avec l'IL-15 sont illustrés). Après les quatre jours de culture, le nombre de cellules récoltées était environ quatre fois plus grand que le nombre de départ. D'abord, aucun changement notable n'a été observé dans la taille relative des populations NK et T DN exprimant le récepteur Ly49A (Figure 6). La proportion de cellules T DN Ly49C<sup>+</sup> a augmenté tandis que celle des cellules NK Ly49C<sup>+</sup> est demeurée la même. Le pourcentage de cellules décelées avec l'anticorps anti-Ly49C/I a diminué pour les cellules NK, mais est demeuré stable pour les cellules T DN. Ces résultats suggèrent donc une réduction de la taille des populations exprimant Ly49I. La proportion des cellules NK exprimant Ly49G2 n'a pas varié suite à la culture, par contre la proportion de lymphocytes T DN exprimant ce récepteur a augmenté légèrement suite aux cultures en présence d'IL-2 ou d'IL-15. Il faut noter que bien que les résultats soient significatifs, les variations de l'expression des récepteurs Ly49 ne sont pas très marquées.

Les niveaux d'expression de certains récepteurs ont été modulés lors des cultures dans ces mêmes conditions (Figure 7). Après culture en présence d'IL-2 ou d'IL-15, l'intensité d'expression du récepteur Ly49C a augmenté légèrement, surtout sur les lymphocytes T DN. En d'autres mots, la proportion des cellules T DN exprimant le



**Figure 6. Modulation de la fréquence relative des cellules NK et les lymphocytes T DN spléniques après culture en présence d'IL-15.**

La fréquence des cellules exprimant des récepteurs Ly49 correspond aux données présentées à la figure 5 pour les cellules fraîchement isolées de la rate de souris C57BL/6. Les cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon et débarrassées des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ont été cultivées 4 jours en présence de 300 ng d'IL-15. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux tel que décrit à la figure 4, plus de 80 000 événements étant analysés par échantillon. Les résultats présentés sont la moyenne et l'écart type de 7 et 5 expériences respectivement pour les cellules fraîches et les cellules cultivées. (\* :  $p < 0,05$  par rapport aux cellules fraîches)



**Figure 7. Modulation du niveau d'expression (MFI) des récepteurs Ly49 sur les cellules NK et les lymphocytes T DN suite à une culture en présence d'IL-15.**

Les cellules analysées sont les mêmes que celles présentées à la figure 6. Les résultats sont ceux d'une expérience représentative d'au moins deux autres expériences similaires. Les valeurs des MFI pour chaque condition sont inscrites dans le haut des histogrammes.

récepteur Ly49C ainsi que le niveau d'expression de ce récepteur ont augmenté en présence d'IL-2 ou d'IL-15. Les niveaux d'expression du récepteur Ly49G2 ont augmenté sur les deux populations testées tandis qu'aucun changement important n'a été mesuré pour les récepteurs Ly49A et Ly49C/I. La variation de la durée des cultures et une concentration plus forte des cytokines n'ont pas modifié ces résultats. En effet, des cultures dans les mêmes conditions d'une durée de trois à six jours ont donné les mêmes résultats de même que les cultures dans lesquelles les cytokines étaient de trois à cinq fois plus concentrées (résultats non illustrés). Dans l'ensemble, ces travaux montrent que les différents récepteurs Ly49 ne seraient pas modulés uniformément sur les cellules NK et NKT DN par les interleukines IL-2 et IL-15.

Dans le cas de l'IL-12, cette cytokine ne permettant pas à elle seule la croissance cellulaire, les cellules ont d'abord été cultivées cinq jours en présence d'IL-2. Ensuite les cellules ont été remises dans du nouveau milieu contenant seulement une quantité minimale d'IL-2 pour permettre leur survie puis l'IL-12 a été ajoutée. La présence de cette cytokine dans le milieu de culture n'a eu aucun effet pas plus sur les pourcentages de cellules positives que sur les niveaux d'expression des récepteurs Ly49 pour chacune des populations cellulaires testées (résultats non illustrés).

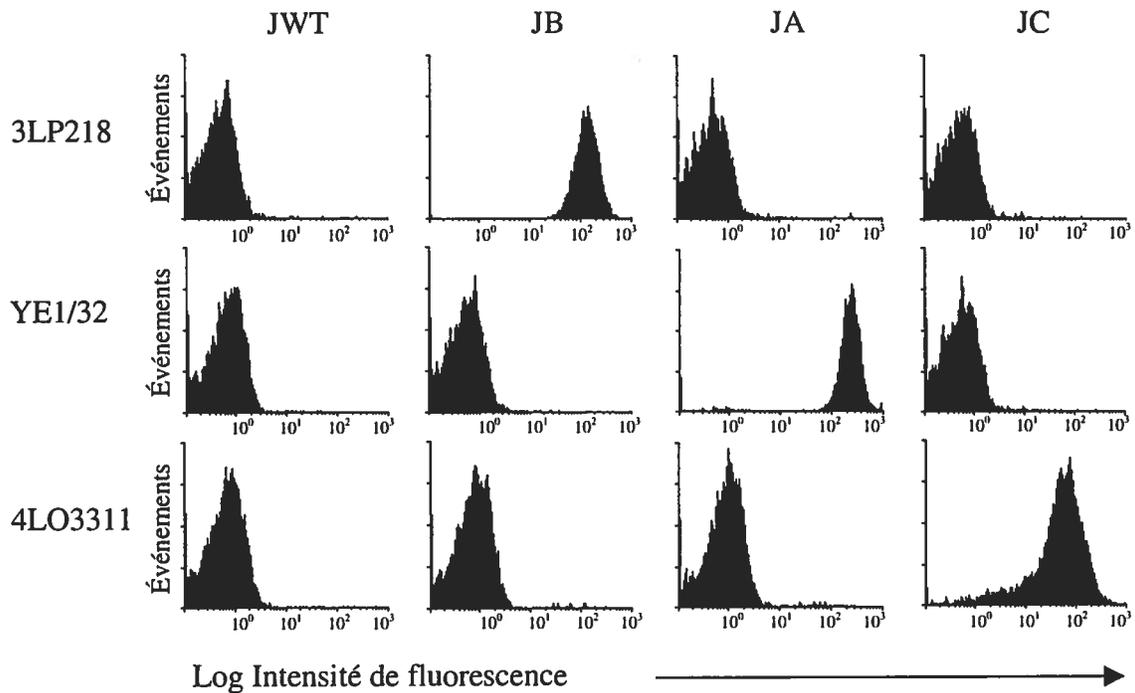
En bref, les analyses effectuées dans les deux premières sections de la partie expérimentale de ce mémoire établissent une expression préférentielle de certains récepteurs Ly49 inhibiteurs selon la sous-population cellulaire concernée. Ly49A et Ly49G2 sont davantage présents sur les lymphocytes T DN et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> alors que les récepteurs Ly49C et Ly49I sont surtout présents sur les cellules NK. La fréquence des cellules exprimant un récepteur particulier de même que son niveau d'expression peuvent être modulés en présence d'IL-2 ou d'IL-15 mais l'effet varie selon le récepteur et la population cellulaire concernée. L'IL-12 n'a pas d'effet sur ces deux paramètres, à tout le moins dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées.

### **3. Analyse de l'expression, des caractéristiques structurales et des propriétés fonctionnelles du récepteur Ly49B**

Tel que mentionné précédemment, Ly49B est un membre de la famille Ly49 ayant aussi un potentiel inhibiteur en raison de la présence d'un ITIM dans sa portion intracytoplasmique. Aucun anticorps monoclonal réagissant avec Ly49B n'avait encore été rapporté. Donc, l'expression et les propriétés fonctionnelles de ce récepteur, codé dans le NKC à 750 pb du groupe des autres récepteurs Ly49, n'avaient pas encore pu être étudiées. À la fin de ses travaux de maîtrise, une étudiante de notre laboratoire a récemment réussi à sélectionner un hybridome sécrétant un anticorps réagissant sélectivement avec des cellules Jurkat humaines transfectées avec l'ADNc de Ly49B (JB) (Lévesque, 2002). Cet hybridome avait été obtenu suite à la fusion avec des cellules myélomateuses de souris P3X63Ag8.653 et des cellules spléniques d'un rat Fisher CDF (F344) (Charles River) immunisé avec les cellules JB. La troisième partie expérimentale de ce mémoire a porté sur le clonage de cet hybridome et sur l'analyse de l'expression, des caractéristiques structurales et des propriétés fonctionnelles du récepteur Ly49B à l'aide de l'anticorps produit par cet hybridome.

#### **3.1. Spécificité de l'anticorps 3LP218**

D'abord, j'ai cloné l'hybridome 6G5 par dilution limite à deux autres reprises et l'anticorps monoclonal présent dans le surnageant de culture du clone 6G51C82A8 a été purifié sur colonne de protéine G Sepharose™ 4 Fast Flow. La spécificité de l'anticorps que nous avons nommé 3LP218 a été évaluée par cytométrie en flux en utilisant des cellules Jurkat parentales ou des transfectants stables exprimant Ly49B (JB), Ly49A (JA), ou Ly49C (JC). Tel qu'illustré dans la figure 8, l'anticorps 3LP218 marque la totalité des cellules JB, mais ne reconnaît pas les cellules JWT, JA et JC. L'expression des récepteurs Ly49A et Ly49C par les cellules JA et JC est confirmée dans la même figure grâce aux anticorps monoclonaux YE1/32 (anti-Ly49A) et 4LO3311 (anti-Ly49C). Étant donné le haut degré d'homologie entre les membres du groupe Ly49A-like (87 à 88%) et du groupe



**Figure 8. Analyse de spécificité de l'anticorps 3LP218.**

La spécificité de l'anticorps 3LP218 a été déterminée en fonction de sa réactivité avec les cellules JWT ou des transfectants stables exprimant les récepteur Ly49B (JB), Ly49A (JA) ou Ly49C (JC). Ly49A et Ly49C sont utilisés ici comme récepteurs prototypes des groupes Ly49A-like ou Ly49C-like. L'expression spécifique des récepteurs Ly49A et Ly49C sur les transfectants a été confirmée avec les anticorps YE1/32 (anti-Ly49A) et 4LO3311 (anti-Ly49C). Tous les anticorps étaient biotinylés et ils ont été révélés avec le conjugué Streptavidine-Cy-Chrome™. L'expérience illustrée est représentative d'au moins deux autres expériences similaires.

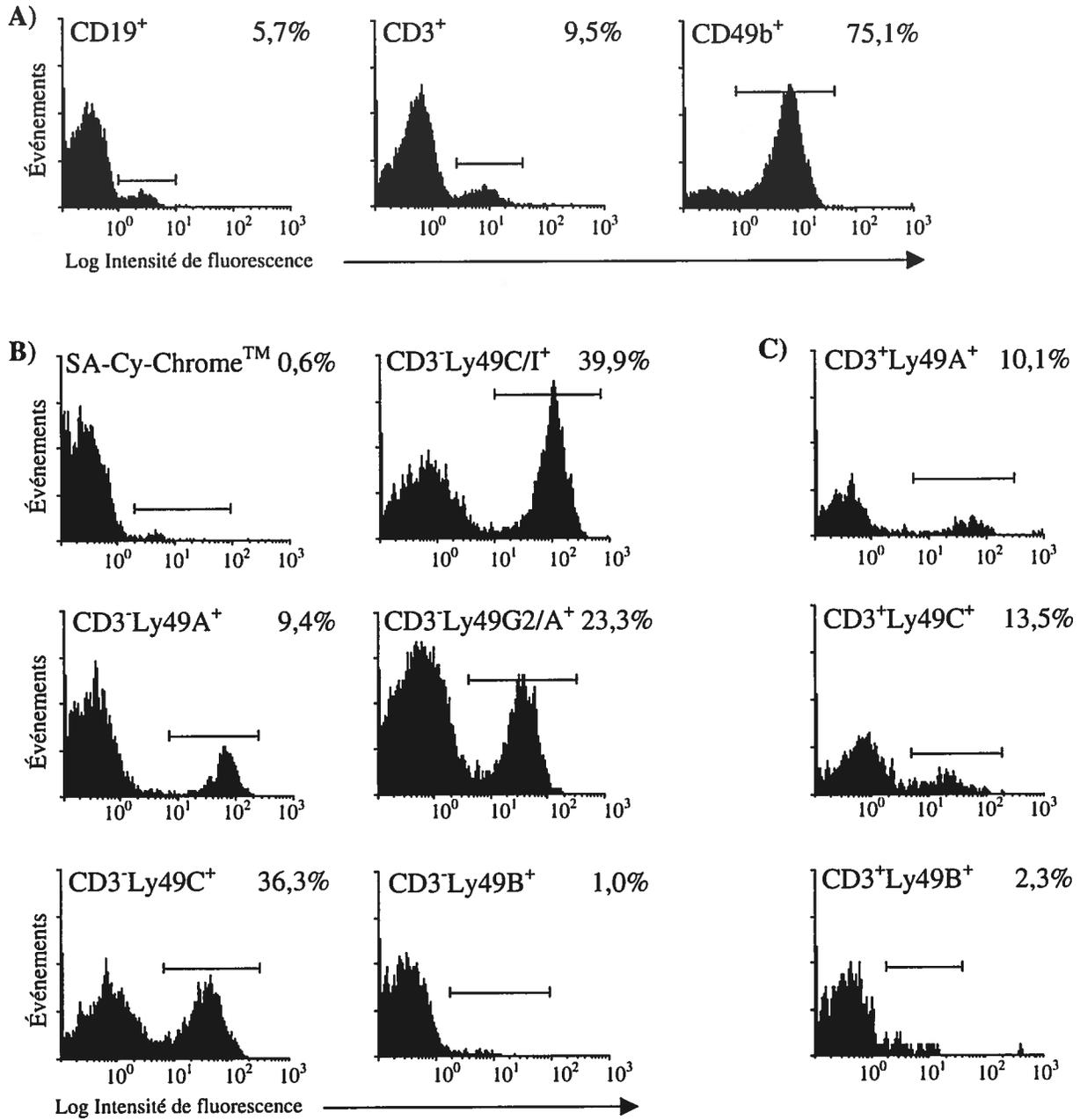
Ly49C-like (89 à 96%), il y a de fortes chances que 3LP218 ne réagisse pas non plus avec les autres récepteurs de ces deux groupes et qu'il soit dès lors spécifique à Ly49B.

### **3.2. Expression du récepteur Ly49B**

L'allèle du gène *ly49b* de la souris BALB/c est identique à 100% à celui de la souris CBA qui a été utilisé pour produire les transfectants JB. Étant donné qu'il nous était plus facile d'obtenir des souris BALB/c que des CBA, nous avons décidé d'effectuer les expériences de caractérisation de l'expression du récepteur Ly49B en utilisant principalement des souris BALB/c.

#### **3.2.1. Expression de récepteurs Ly49 par les cellules NK et les cellules T CD3<sup>+</sup> DN spléniques de souris BALB/c**

Étant donné que les cellules exprimant des récepteurs Ly49 sont principalement des cellules NK et des sous-populations de lymphocytes T, nous avons commencé par analyser l'expression du récepteur Ly49B par les cellules NK et les cellules T CD3<sup>+</sup> DN spléniques de souris BALB/c. L'enrichissement des cellules NK a permis l'élimination de la grande majorité des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. La suspension cellulaire obtenue était effectivement composée surtout de cellules NK et de lymphocytes T DN puisque 75% des cellules ont réagi avec l'anticorps DX5, moins de 6% avec l'anticorps anti-CD19 et moins de 10% avec un l'anticorps anti-CD3 (Figure 9A). Nous avons dû utiliser l'anticorps DX5 pour détecter les cellules NK chez la souris BALB/c car le récepteur NK1.1 (détecté par l'anticorps PK136) n'est pas exprimé par cette souche. Toutefois, l'antigène reconnu par l'anticorps DX5 n'est pas exprimé par la totalité des cellules NK et NKT. Pour cette raison, nous avons analysé l'expression des récepteurs Ly49 sur les cellules CD3<sup>-</sup> (population composée en grande majorité par les cellules NK) et sur les cellules CD3<sup>+</sup> (cellules T DN). Alors que des taux significatifs de cellules CD3<sup>-</sup> réagissant avec des anticorps monoclonaux reconnaissant les récepteurs Ly49A (YE1/32), Ly49C (4LO3311), Ly49C/I (5GA5) et Ly49G2/A (4D11) ont été observés, on ne détecte pratiquement pas de cellules exprimant le récepteur Ly49B (3LP218<sup>+</sup>) (Figure 9B). Nous



**Figure 9. Expression de récepteurs Ly49 dont Ly49B par les cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon après déplétion des cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.**

A) La qualité de l'enrichissement en cellules NK a été évaluée en fonction de la réactivité des cellules avec des anticorps monoclonaux spécifiques des cellules B (anti-CD19-FITC), des cellules T (anti-CD3-FITC) et des cellules NK (DX5-PE, anti-CD49b). B) L'expression des récepteurs Ly49 sur les cellules spléniques de souris BALB/c enrichies en cellules NK a été déterminée sur les cellules CD3<sup>-</sup> (en grande majorité des cellules NK) avec les anticorps monoclonaux biotinylés YE1/32 (anti-Ly49A), 4LO3311 (anti-Ly49C), 5GA5 (anti-Ly49C/I), 4D11 (anti-Ly49G2/A) et 3LP218 (anti-Ly49B). C) Les mêmes anticorps ont été utilisés pour évaluer l'expression des récepteurs Ly49A, Ly49C et Ly49B par les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> DN. Les résultats présentés sont ceux d'une expérience représentative de deux autres expériences similaires.

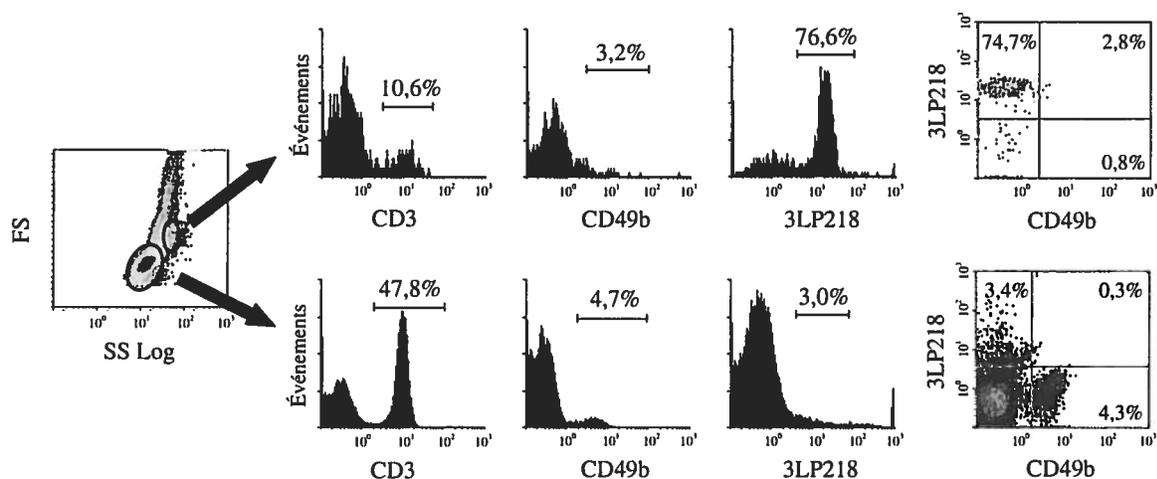
avons dû utiliser l'anticorps 4D11 pour détecter le récepteur Ly49G2 et non pas 4LO439 car celui-ci est spécifique à l'allèle retrouvé chez la souris C57BL/6. Ly49B ne semble pas être exprimé non plus sur les lymphocytes T  $CD3^+ CD4^- CD8^-$  (Figure 9C).

### 3.2.2. Expression du récepteur Ly49B dans la rate non enrichie

Puisque le récepteur Ly49B ne semble pas exprimé par les cellules que nous croyions les plus susceptibles de le faire, soit les cellules NK, nous avons ensuite évalué l'expression de cette protéine par les cellules de la rate après que seuls les érythrocytes aient été enlevés de la suspension. La population lymphocytaire (cellules de taille moyenne et peu granulaires) qui contient tel qu'attendu 40% de lymphocytes T et 4,5% de cellules NK ( $DX5^+$ ) contient peu de cellules exprimant le récepteur Ly49B, soit environ 3% (Figure 10). Par contre, une petite population de cellules de grande taille et très granulaires expriment à environ 75% ce récepteur. Les cellules  $3LP218^+$  ne sont vraisemblablement pas des NK, puisque l'analyse en double marquage démontre qu'elles ne coexpriment pas CD49b détecté par l'anticorps DX5.

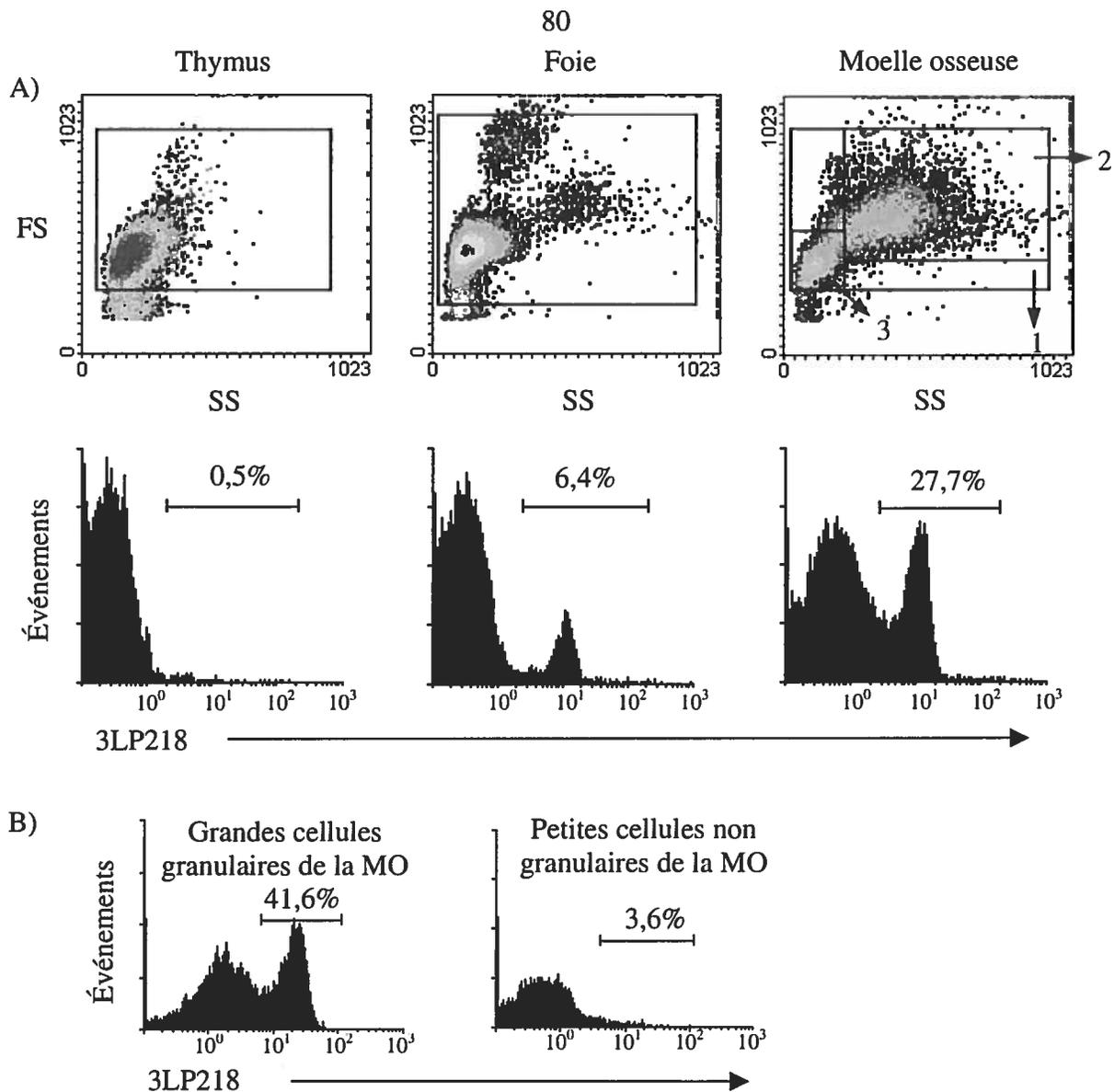
### 3.3. Expression du récepteur Ly49B dans d'autres organes de souris BALB/c

Nous avons ensuite recherché la présence du récepteur Ly49B dans d'autres organes, soit le thymus, le foie et la moelle osseuse. L'analyse a porté sur les thymocytes matures ( $CD24^-$ ), les leucocytes intrahépatiques isolés par centrifugation sur Percoll et les cellules de moelle osseuse non fractionnées. Tel qu'illustré dans la figure 11A, le récepteur Ly49B n'est pas exprimé par les thymocytes matures pas plus que par les thymocytes totaux (résultat non illustré). Sur la base de la taille et la granularité des cellules, au moins trois populations cellulaires sont retrouvées dans le foie (Figure 11A, histogramme du haut). Les cellules  $Ly49B^+$  sont presque toutes situées dans la population de cellules présentant la plus forte granularité (non illustré). Toutefois, la population  $Ly49B^+$  ne représente qu'environ 6% de la population totale des leucocytes intrahépatiques. Par ailleurs, ce récepteur est exprimé de façon importante par les cellules de la moelle osseuse, puisque le quart de la population réagit avec l'anticorps 3LP218. De



**Figure 10. Expression du récepteur Ly49B par les cellules spléniques non enrichies de la souris BALB/c.**

Les cellules spléniques analysées sur la base de leur taille (FS) et de leur granularité (SS) se distribuent en deux régions principales (histogramme de gauche). L'expression des récepteurs CD3, CD49b (DX5<sup>+</sup>) et Ly49B (3LP218<sup>+</sup>) par les deux sous-populations définies dans les zones indiquées a ensuite été établie. Les histogrammes de droite illustrent la coexpression des protéines CD49b et Ly49B après coloration des cellules avec les anticorps DX5-PE et 3LP218 biotinylé. La réactivité de l'anticorps biotinylé a été révélée avec le conjugué Streptavidine-Cy-Chrome™.



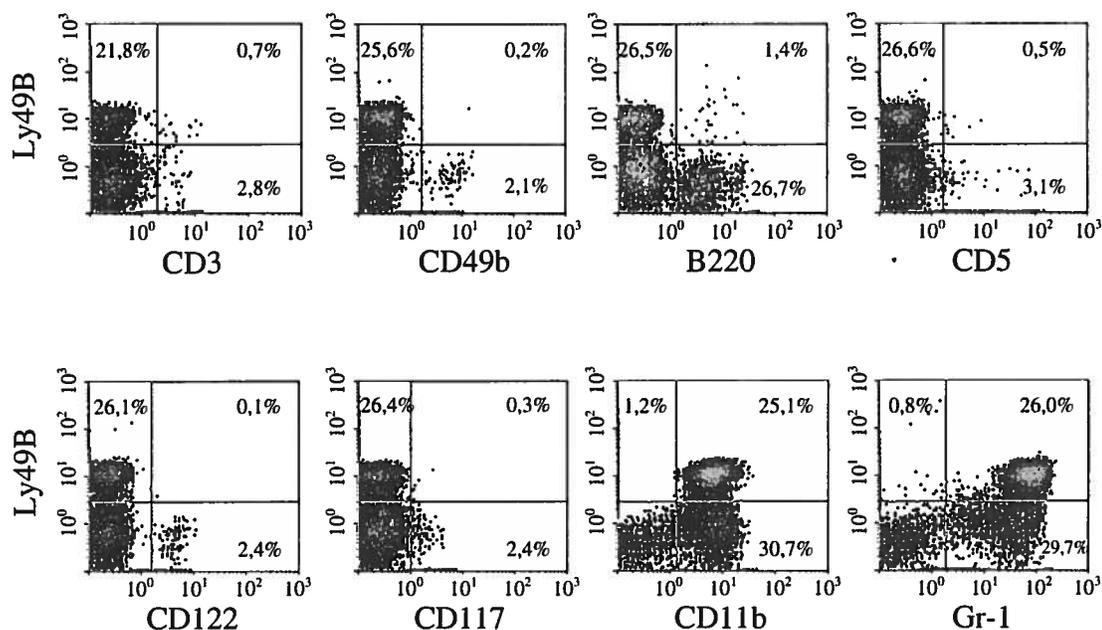
**Figure 11. Expression du récepteur Ly49B dans différents organes de souris BALB/c.**

A) Les thymocytes matures ( $CD24^-$ ) ont été obtenus suite à la déplétion des cellules  $CD24^+$  avec un surnageant de culture de l'hybridome J11D et du complément de lapin. Les leucocytes du foie ont été isolés par centrifugation dans une solution de Percoll™ 30%. Les globules rouges ont été éliminés de la suspension par choc osmotique. Les leucocytes de la moelle osseuse (MO) ont été obtenus après lyse des globules rouges de la moelle extraite des fémurs et tibias. Les cellules marquées par l'anticorps 3LP218 biotinylé ont été analysées à partir des populations encadrées dans les graphiques du haut. Pour la moelle osseuse, la zone #1 correspond aux leucocytes totaux. B) La réactivité de l'anticorps 3LP218 a ensuite été analysée sur la base de la taille et la granularité des cellules de la moelle osseuse. Les grandes cellules granulaires sont retrouvées dans la zone #2 tandis que les petites cellules non granulaires sont dans la zone #3 (histogramme de la moelle osseuse en A en haut à droite). Ces résultats sont représentatifs d'au moins deux autres expériences similaires par organe.

plus, tout comme dans la rate, ce sont des cellules de moelle osseuse de forte taille et très granulaires qui expriment Ly49B. En effet, plus de 40% de ces cellules sont Ly49B<sup>+</sup>, comparativement à moins de 4% dans la population qui contient surtout des lymphocytes (Figure 11B).

### 3.4. Phénotype des cellules de la moelle osseuse exprimant le récepteur Ly49B

Afin de déterminer plus précisément le type cellulaire responsable de l'expression du récepteur Ly49B, nous avons évalué par cytométrie en flux, la coexpression de Ly49B avec d'autres marqueurs cellulaires (Figure 12). Tout comme dans la rate, les cellules T (CD3<sup>+</sup>) et les cellules NK (DX5<sup>+</sup>) de la moelle osseuse n'expriment pas Ly49B en proportion importante. La majorité des cellules exprimant le marqueur B220 (CD45R) n'expriment pas Ly49B. B220 est une glycoprotéine surtout exprimée par les cellules B et aussi par certaines cellules NK et certaines cellules T. Étant donné qu'il y a très peu de cellules NK et de cellules T dans la moelle osseuse et qu'elles ne semblent pas coexprimer Ly49B, il est fort probable que les quelques cellules qui sont B220<sup>+</sup>Ly49B<sup>+</sup> soient une sous-population de cellules B. Pour évaluer si cette sous-population ne pourrait pas être des cellules B-1 nous avons mesuré la coexpression de CD5 et Ly49B. CD5 est une protéine exprimée par des cellules T et des cellules B-1. Très peu de coexpression de cette protéine avec le récepteur Ly49B a été détectée, ce qui semble indiquer que ce serait plutôt une sous-population de cellules B conventionnelles qui exprimerait le récepteur Ly49B. Nous avons aussi évalué la coexpression de Ly49B avec CD122 (IL-2/15R $\beta$ ) qui est exprimé surtout par les cellules NK et NKT ainsi que par certaines cellules T, B et les granulocytes. Encore une fois, les rares cellules de la moelle osseuse qui expriment cette protéine n'expriment pas le récepteur Ly49B. Pour évaluer si les précurseurs de cellules NK fraîchement isolés de la moelle osseuse expriment aussi Ly49B, nous avons fait un double marquage avec un anticorps anti-CD117 (c-Kit) qui reconnaît ce type de cellule. Nos résultats montrent que les rares cellules CD117<sup>+</sup> présentes dans la moelle osseuse n'expriment pas le récepteur Ly49B. L'ensemble de ces résultats montre donc que la grande majorité des cellules Ly49B<sup>+</sup> dans la moelle osseuse n'appartiennent pas à la lignée lymphoïde. Nous avons donc examiné la lignée myéloïde, surtout représentée par



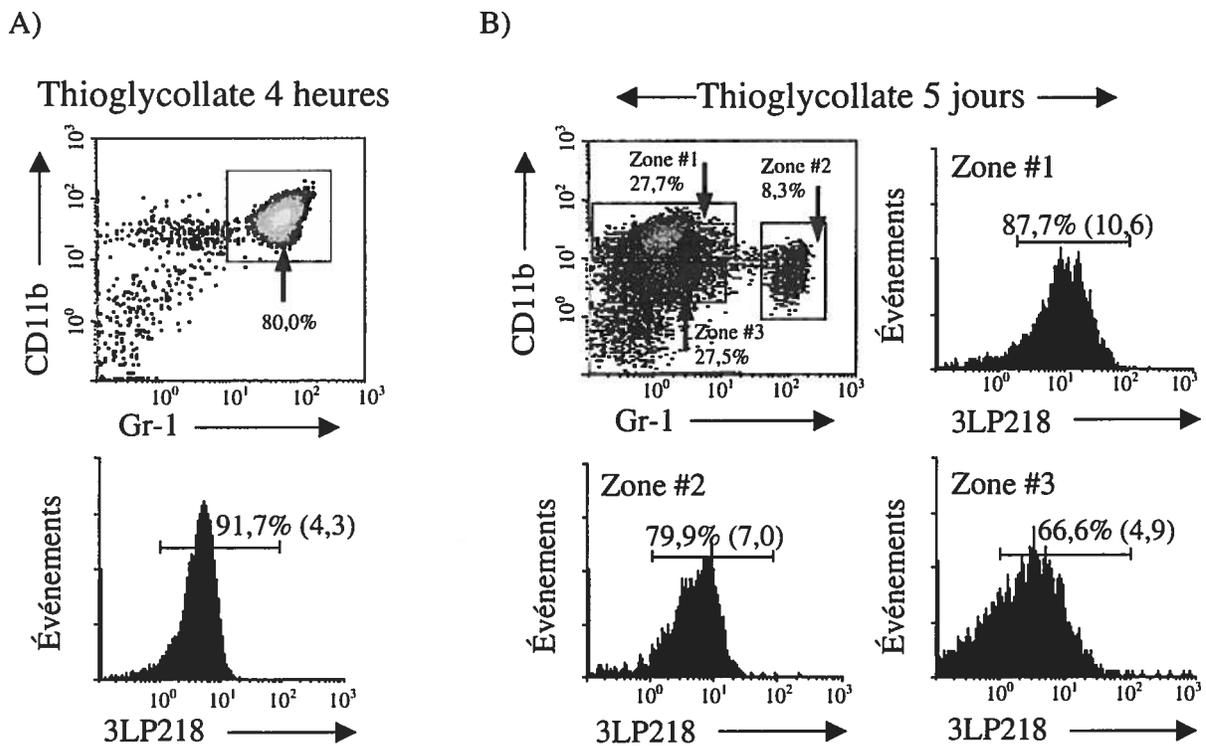
**Figure 12. Phénotype des cellules de la moelle osseuse de souris BALB/c exprimant le récepteur Ly49B.**

Après déplétion des érythrocytes, les cellules leucocytaires totales de la moelle osseuse ont été analysées par cytométrie en flux pour la coexpression du récepteur Ly49B (3LP218 biotinylé) avec d'autres marqueurs cellulaires soit CD3 (145-2C11-FITC), CD49b (DX5-PE), B220 (RA3-6B2-FITC), CD5 (53-7.3-PE), CD122 (TM-β1-PE), CD117 (ACK4-FITC), CD11b (M1/70-FITC) et Gr-1 (RB6-8C5-PE). 25000 événements par échantillon ont été analysés. Ces résultats sont représentatifs d'au moins deux autres expériences.

les monocytes et les granulocytes dans cet organe. Pour ce faire, nous avons utilisé les marqueurs CD11b (Mac-1) et Gr-1 (Ly-6G). CD11b est la chaîne  $\alpha_M$  d'une  $\alpha_M\beta_2$  intégrine exprimée par plusieurs types cellulaires comprenant les granulocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK et les cellules B-1. Les résultats montrent qu'un peu moins de la moitié des cellules CD11b<sup>+</sup> de la moelle osseuse expriment aussi Ly49B et la presque totalité des cellules Ly49B<sup>+</sup> expriment aussi la protéine d'adhésion CD11b. Dans le cas de Gr-1, cette protéine est exprimée par certains monocytes/macrophages et de façon plus intense par les granulocytes. En fait, dans la moelle osseuse, l'intensité d'expression de Gr-1 par les granulocytes est proportionnelle à leur niveau de différenciation et de maturation (Hestdal *et al.*, 1991). Environ la moitié des cellules exprimant Gr-1 coexpriment le récepteur Ly49B. De plus, tout comme pour CD11b, la presque totalité des cellules Ly49B<sup>+</sup> sont aussi Gr-1<sup>+</sup>. Donc, les résultats d'expression du récepteur Ly49B dans la moelle osseuse indiquent que cette protéine est exprimée surtout par des granulocytes et possiblement par certains monocytes/macrophages.

### 3.5. Expression du récepteur Ly49B par les cellules de la cavité péritonéale

Pour confirmer que les cellules exprimant le récepteur Ly49B sont des granulocytes et des monocytes/macrophages, nous avons provoqué une réponse inflammatoire dans la cavité péritonéale de souris BALB/c en y injectant du thioglycollate 3%. Étant donné les propriétés différentes de migration des granulocytes et des macrophages au site d'inflammation, la population cellulaire présente dans la cavité péritonéale va varier selon la durée de l'inflammation. Les granulocytes (majoritairement des polynucléaires neutrophiles) sont les premières cellules à arriver au site d'inflammation, si bien que quatre heures après l'injection de thioglycollate, la population cellulaire est relativement homogène, tel qu'illustré par le patron d'expression des marqueurs CD11b et Gr-1 (Figure 13A). La grande majorité de ces cellules expriment le récepteur Ly49B. D'autre part, si les cellules sont prélevées cinq jours après l'injection de thioglycollate, la population cellulaire est beaucoup plus hétérogène et comprend à ce moment beaucoup plus de macrophages qui sont arrivés au site d'inflammation plus



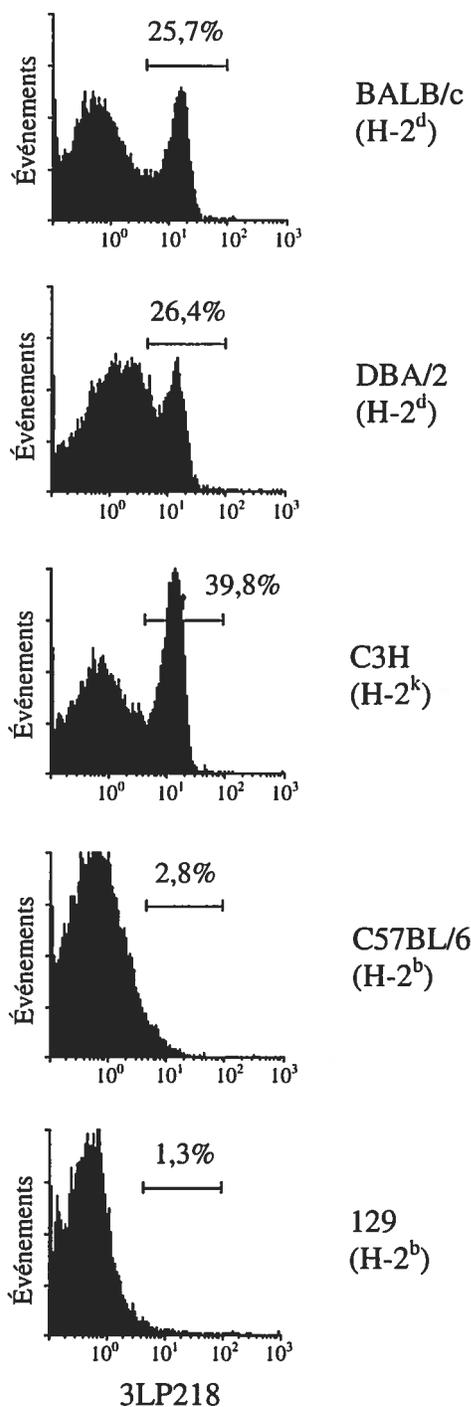
**Figure 13. Expression du récepteur Ly49B par les cellules de la cavité péritonéale après stimulation au thioglycollate 3%.**

A) Les souris BALB/c ont été injectées dans la cavité péritonéale avec du thioglycollate 3%. Les cellules ont été récoltées 4 heures plus tard. Elles ont été analysées pour leur réactivité avec les anticorps M1/70 (anti-CD11b-FITC), RB6-8C5 (anti-Gr-1-PE) et 3LP218 biotinylé révélé avec le conjugué Streptavidine-Cy-Chrome™. Dans chaque histogramme, le pourcentage de cellules positives est inscrit, suivi par la valeur de la MFI entre parenthèses. B) D'autres souris ont aussi été injectées dans la cavité péritonéale avec du thioglycollate 3%. Les cellules qui ont été récoltées 5 jours après l'injection ont été analysées avec les mêmes anticorps qu'en A. L'expression du récepteur Ly49B a été comparée sur les populations définies selon l'expression des marqueurs CD11b et Gr-1. Chaque population est encadrée (zones 1 à 3 dans l'histogramme du haut à gauche) et sa taille relative est indiquée. Les expériences illustrées sont représentatives de quatre (A) et deux autres (B) expériences similaires.

tardivement que les granulocytes. Dans ce cas au moins trois populations peuvent être définies selon les niveaux d'expression de CD11b et Gr-1. Comme le montre la figure 13B, ces différentes populations expriment le récepteur Ly49B à des proportions et des intensités différentes. La population qui exprime le plus Ly49B avec 87% (MFI = 10,6) des cellules positives est celle qui coexprime fortement CD11b avec un niveau faible ou nul de Gr-1 (Figure 13B zone #1). La population dans la zone #2 caractérisée par une expression plus faible de CD11b et très forte de Gr-1 coexprime Ly49B à environ 80%, par contre l'intensité de son expression sur les cellules est légèrement plus faible que sur la population précédente (MFI = 7,0). La population retrouvée dans la zone 3 sur la figure 13B est caractérisée par une faible expression du marqueur CD11b et une expression faible ou nulle de Gr-1; cette population coexprime aussi plus faiblement le récepteur Ly49B que les deux autres populations. En effet, les deux tiers des cellules expriment Ly49B et ce à une intensité faible (MFI = 4,9). Les résultats obtenus avec les cellules de la cavité péritonéale confirment donc que le récepteur Ly49B est exprimé sur les cellules de la lignée myéloïde, surtout par les granulocytes ainsi que par les macrophages.

### **3.6. Comparaison de l'expression du récepteur Ly49B par différentes souches de souris**

L'étape suivante a été d'évaluer l'expression du récepteur Ly49B chez d'autres souches de souris. Les mesures ont été faites par l'analyse cytofluorométrique des cellules de la moelle osseuse après coloration avec l'anticorps 3LP218 biotinylé. Nous avons comparé la réactivité de l'anticorps sur des cellules de moelle osseuse de trois souches de souris exprimant le même allèle *Ly49b* (i.e. BALB/c, C3H et DBA/2) et sur celles des souris C57BL/6 et 129 qui expriment des allèles différents. Les résultats montrent que parmi les souris testées, c'est chez la souche C3H (H-2<sup>k</sup>) que la plus grande proportion de cellules Ly49B<sup>+</sup> est détectée, soit près de 40% (Figure 14). Les deux souris de l'haplotype H-2<sup>d</sup>, soit BALB/c et DBA/2, expriment ce récepteur à un pourcentage similaire représentant environ le quart des cellules. Il n'y a pas de différence importante en ce qui concerne l'intensité de l'expression de Ly49B par les cellules de moelle osseuse de ces



**Figure 14. Expression du récepteur Ly49B par différentes souches de souris.**

Les cellules de la moelle ont été obtenues à partir des fémurs et tibias des souris. Après déplétion des érythrocytes par choc osmotique, la réactivité des cellules avec l'anticorps 3LP218 biotinylé a été testée et révélée avec le conjugué Streptavidine-Cy-Chrome™. Les résultats sont représentatifs d'au moins une autre expérience similaire.

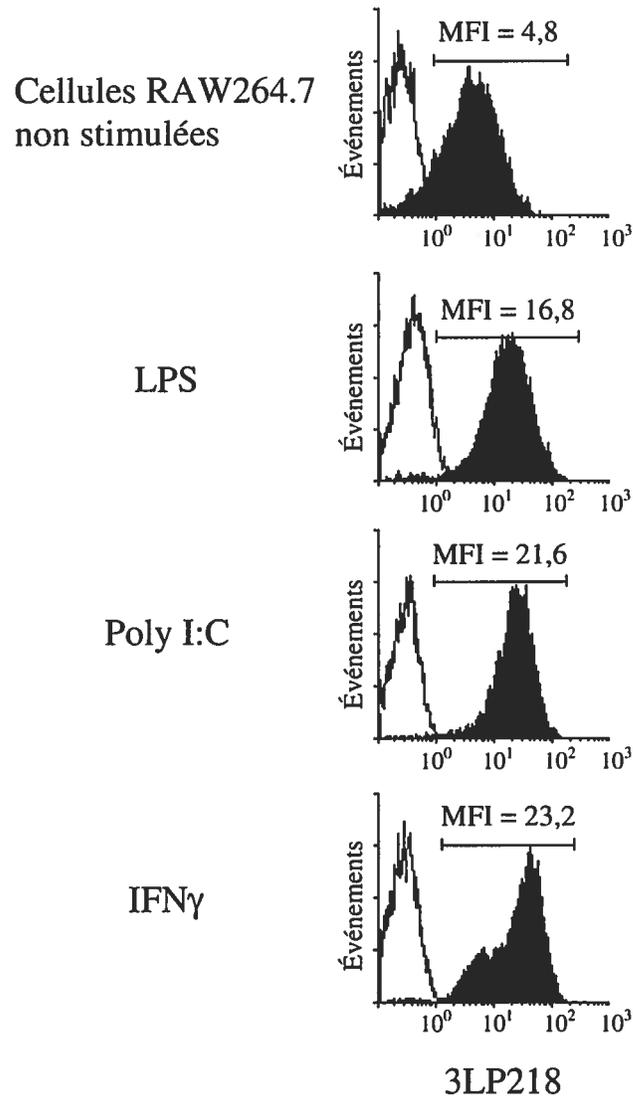
trois souches de souris. Le récepteur Ly49B n'est pas détecté par cytométrie en flux chez les deux souches de l'haplotype H-2<sup>b</sup> soit les souris C57BL/6 et 129.

### **3.7. Expression du récepteur Ly49B par la lignée de macrophages RAW264.7 et modulation de son niveau d'expression**

Les résultats de l'expression du récepteur Ly49B par les cellules de la cavité péritonéale indiquent clairement que cette protéine est exprimée par des granulocytes ainsi que par d'autres populations, probablement des monocytes/macrophages. Pour nous assurer que c'est effectivement le cas, nous avons évalué l'expression du récepteur Ly49B par deux lignées cellulaires de macrophages issues de la souris BALB/c.

Tel que le démontre la figure 15, le récepteur Ly49B est exprimé par les cellules RAW264.7. Le niveau d'expression du récepteur Ly49B sur les cellules non stimulées est relativement faible, la valeur de la MFI étant de 4,8 alors qu'elle a une valeur variant entre 10 et 12 dans la moelle osseuse (Figure 11A). Par contre, une incubation de 16 heures de ces cellules en présence de LPS (100 ng/ml), de Poly I:C (20 µg/ml) ou d'IFN $\gamma$  (100 U/ml) a permis de faire augmenter le niveau d'expression de ce récepteur. L'augmentation la plus importante a été décelée suite à la culture des cellules en présence d'IFN $\gamma$  qui a haussé la valeur de la MFI d'environ cinq fois, comparativement aux cellules non stimulées.

Nous avons aussi évalué la présence du récepteur Ly49B sur les cellules J774A.1, qui constituent une autre lignée de macrophages provenant également de la souris BALB/c. Ces cellules expriment le récepteur Ly49B à un niveau très faible, si bien qu'il est difficilement détectable par cytométrie en flux (résultats non illustrés). Par contre, comme pour la lignée RAW264.7, l'intensité de l'expression mesurée était plus forte suite à une stimulation par le LPS ou l'IFN $\gamma$ . La modulation est toutefois moins importante chez les cellules J774A.1 que chez les cellules RAW264.7.



**Figure 15. Expression du récepteur Ly49B par une lignée cellulaire de macrophages et modulation de son niveau d'expression.**

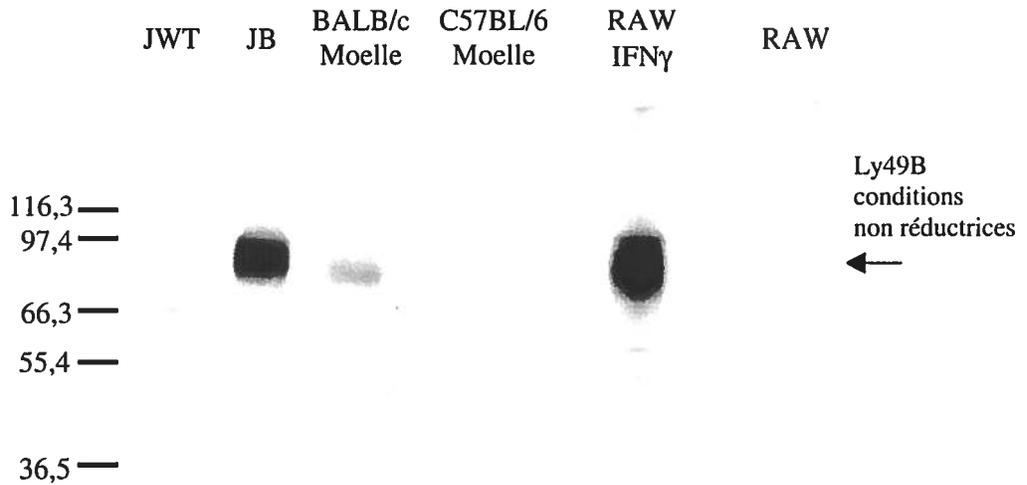
Les cellules RAW264.7 ont été incubées 16 heures à 37°C dans du DMEMc 10% SVF additionné de LPS (100 ng/ml), de Poly I:C (20  $\mu$ g/ml) ou d'IFN $\gamma$  (100 U/ml). Les cellules non stimulées ont été incubées dans le même milieu sans agent stimulateur. La réactivité des cellules avec l'anticorps 3LP218 biotinylé a ensuite été évaluée. Un anticorps de rat anti-CD8-FITC a été utilisé comme témoin négatif. 5000 événements ont été analysés par échantillon. Les résultats sont représentatifs d'au moins deux autres expériences similaires.

### 3.8. Caractérisation biochimique du récepteur Ly49B

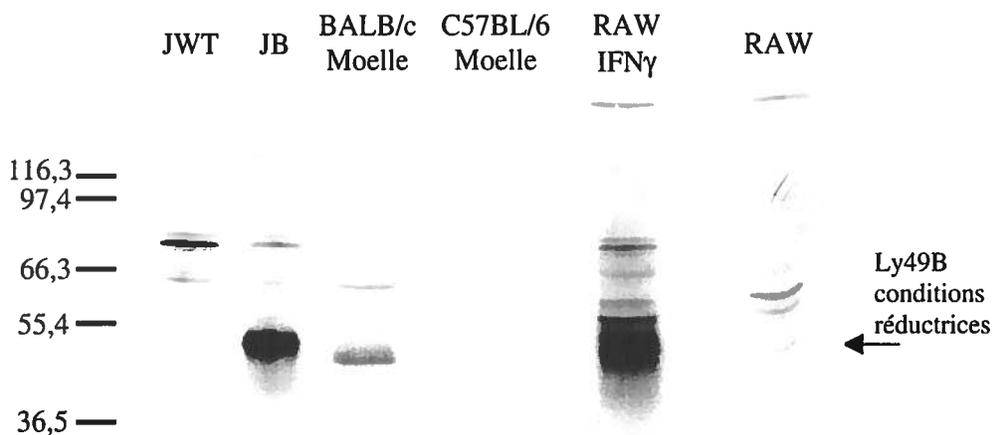
Pour déterminer la masse moléculaire du récepteur Ly49B, nous l'avons immunoprécipité avec l'anticorps 3LP218 à partir des lignées cellulaires JB, RAW264.7 et des cellules de moelle osseuse et de la cavité péritonéale de souris BALB/c et C57BL/6. Les analyses révèlent qu'en conditions non réductrices, la protéine Ly49B a une masse moléculaire d'environ 85 à 90 kDa, cette masse varie légèrement entre le récepteur Ly49B des cellules JB et celui des cellules de souris (Figure 16A). Cet écart s'explique probablement par le fait que Ly49B peut être glycosylé différemment par des cellules humaines comparativement aux cellules de souris. En conditions réductrices, cette même protéine a une masse apparente d'environ 45 kDa, ce qui suggère qu'à l'instar des autres récepteurs Ly49, le récepteur Ly49B est formé de deux sous-unités identiques (Figure 16B). La protéine n'a pas été détectée dans les cellules JWT qui ont servi de témoin négatif. Elle n'a pas non plus été immunoprécipitée par un anticorps de rat d'une autre spécificité (IgG de rat anti-CD8 de souris, résultat non illustré). Par contre, la protéine est bien visible quand elle est immunoprécipitée avec l'anticorps 3LP218 à partir des cellules JB et des cellules de moelle osseuse et de la cavité péritonéale (non illustré) de souris BALB/c. Tel que l'ont montré les résultats de cytométrie en flux, l'anticorps 3LP218 ne détecte pas Ly49B non plus par immunoprécipitation à partir de cellules de souris C57BL/6. Dans le cas des cellules RAW264.7, la protéine Ly49B est difficilement décelable quand elle est immunoprécipitée à partir des cellules non stimulées. Par contre, la bande correspondant à Ly49B est clairement visible lorsque les cellules RAW264.7 ont été incubées en présence d'IFN $\gamma$  avant l'immunoprécipitation, ce qui confirme que l'IFN $\gamma$  induit une augmentation de l'expression du récepteur Ly49B chez ces cellules.

Pour valider nos résultats, nous avons aussi immunoprécipité les récepteurs Ly49A (A1) et Ly49C (5GA5) à partir des cellules JA et JC (résultats non illustrés). Les protéines immunoprécipitées ont une masse moléculaire comparable à celles précipitées à partir de cellules NK spléniques avec les mêmes anticorps, soit 80 kDa pour Ly49A et 130 kDa pour Ly49C (Yokoyama *et al.*, 1989; Gosselin, Lusignan et Lemieux, 1993).

A)



B)



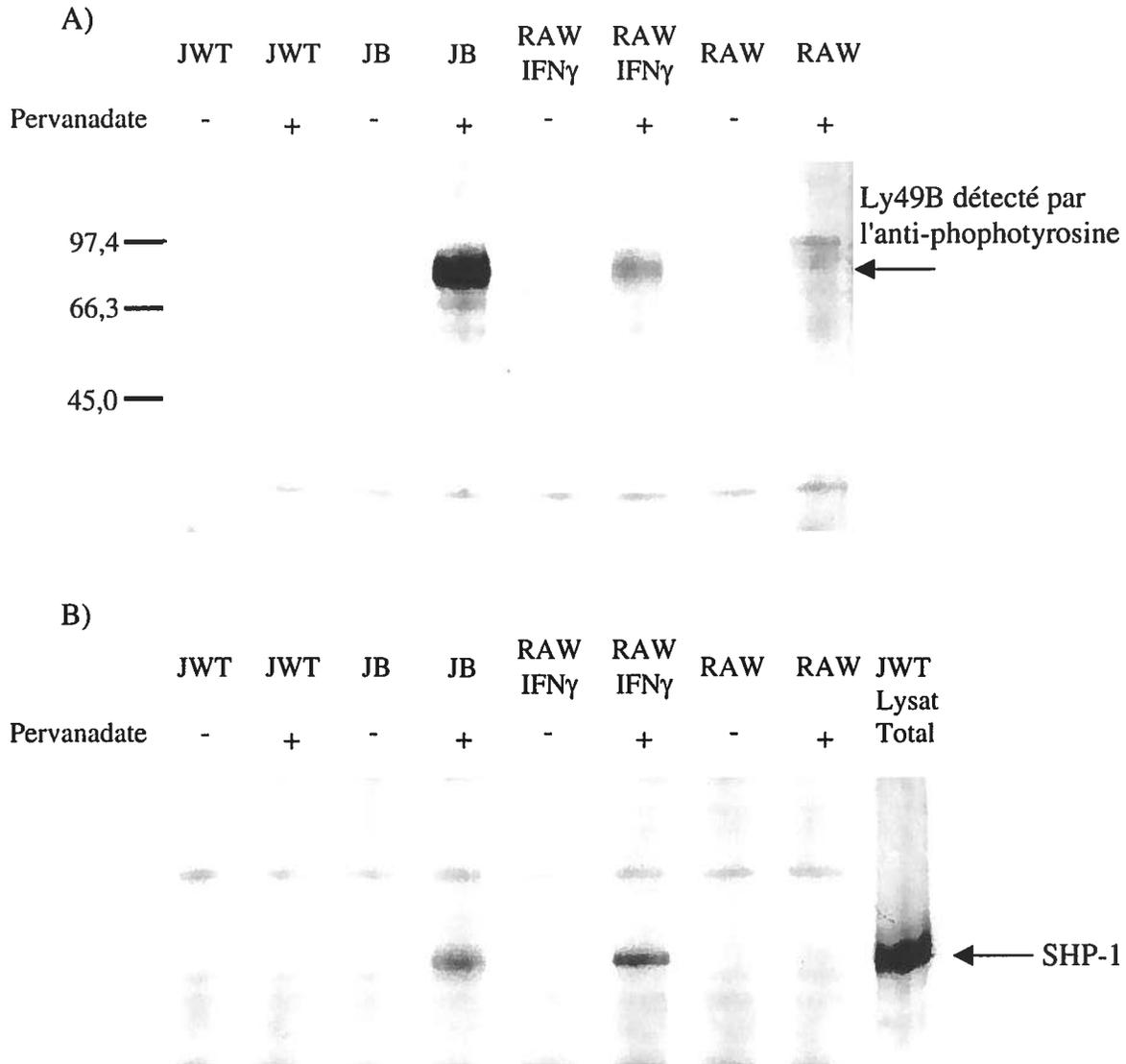
**Figure 16. Immunoprécipitation du récepteur Ly49B.**

A) Les protéines extracellulaires des différentes cellules ont été biotinylées et les cellules ont été lysées et immunoprécipitées avec l'anticorps 3LP218 couplé à la PGS. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE) en conditions non réductrices, transférées sur une membrane, incubées avec la SA-HRP et visualisées par chimioluminescence avec les réactifs ECL Plus<sup>TM</sup>. B) Les mêmes échantillons ont aussi été analysés en conditions réductrices.

### 3.9. Phosphorylation des tyrosines du récepteur Ly49B et recrutement de SHP-1

La présence d'une séquence ITIM dans la portion intracellulaire du récepteur Ly49B laisse supposer qu'il puisse avoir un rôle inhibiteur. Une façon d'évaluer la fonctionnalité des ITIM est de vérifier la phosphorylation sur tyrosine des ITIM du récepteur suite à une stimulation des cellules par le pervanadate. Le pervanadate se forme spontanément à partir d'orthovanadate de sodium en présence de peroxyde d'hydrogène. Il agit en tant qu'inhibiteur de tyrosine phosphatases. L'incubation de cellules en sa présence permet donc l'hyperphosphorylation des résidus tyrosine. En immunoprécipitant la protéine d'intérêt, dans ce cas-ci le récepteur Ly49B, il est possible de vérifier sa phosphorylation sur résidus tyrosine suite à sa migration sur gel de polyacrylamide et son transfert sur une membrane. L'hybridation avec l'anticorps anti-phosphotyrosine 4G10 a permis de montrer la phosphorylation sur tyrosine du récepteur Ly49B immunoprécipité à partir des cellules JB stimulées au pervanadate (Figure 17A). Par contre, aucune phosphorylation sur tyrosine n'a été détectée quand le récepteur Ly49B a été immunoprécipité à partir des cellules JB non stimulées, de même que dans les cas où des cellules JWT stimulées ou non ont été immunoprécipitées avec l'anticorps 3LP218. Pour la lignée de macrophages RAW264.7, le récepteur Ly49B phosphoryllé sur tyrosine n'a pu être détecté que si son expression avait été préalablement induite à la hausse en préincubant les cellules en présence d'IFN $\gamma$ .

Sachant que les résidus tyrosine du récepteur Ly49B sont phosphorylés suite à sa stimulation, nous avons voulu ensuite évaluer sa capacité à induire un signal d'inhibition. Plusieurs récepteurs Ly49 sont reconnus pour initier le signal intracellulaire d'inhibition via le recrutement de la protéine phosphatase SHP-1. Nous avons donc recherché si cette protéine est associée à Ly49B quand les cellules qui l'expriment sont stimulées au pervanadate. Si tel est le cas, SHP-1 devrait coprécipiter avec Ly49B quand ce récepteur est immunoprécipité avec l'anticorps 3LP218. Par immunobuvardage de type western avec un anticorps anti-SHP-1 nous avons pu observer que la protéine phosphatase SHP-1 est coimmunoprécipitée avec le récepteur Ly49B à partir des cellules JB et RAW264.7 (préincubées en présence d'IFN $\gamma$ ) seulement quand celles-ci ont d'abord été stimulées au



**Figure 17. Phosphorylation sur tyrosine du récepteur Ly49B et recrutement de la phosphatase SHP-1.**

A) Les différentes cellules ont été incubées durant 15 min en présence (+) ou en absence (-) de pervanadate et elles ont ensuite été lysées. Le récepteur Ly49B a été immunoprécipité avec l'anticorps 3LP218. Suite à la migration sur gel et au transfert sur membrane, les protéines immunoprécipitées ont été incubées avec un anticorps anti-phosphotyrosine 4G10. Les protéines ont été visualisées suite à une incubation avec un deuxième anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la HRP suivi des réactifs de chimioluminescence ECL Plus. B) Les mêmes échantillons ont aussi été analysés pour la coimmunoprécipitation de la protéine phosphatase SHP-1 avec le récepteur Ly49B. Après le transfert des protéines sur une membrane, celle-ci a été incubée en présence d'un anticorps polyclonal anti-SHP-1 suivi d'un deuxième anticorps polyclonal anti-IgG de lapin couplé à la HRP. Les protéines ont été visualisées par chimioluminescence. Un lysat cellulaire de cellules JWT a été utilisé comme témoin positif de la présence de la phosphatase SHP-1.

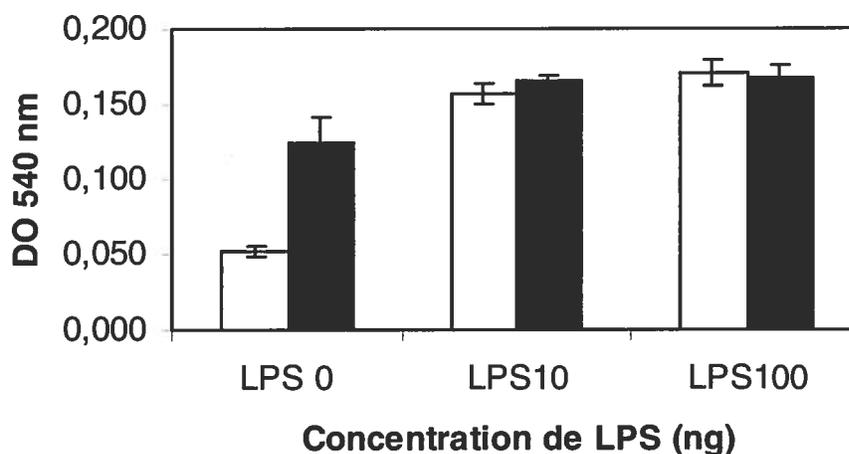
pervanadate. La bande de la protéine SHP-1 est visible à environ 66-68 kDa (Figure 17B). Un lysat des protéines totales de cellules JWT a été utilisé comme témoin positif pour détecter la présence de la phosphatase. Ces résultats démontrent pour la première fois que Ly49B est un récepteur inhibiteur fonctionnel agissant de la même manière que ses congénères en recrutant une phosphatase intracellulaire.

### **3.10. Tentative d'inhibition de l'activité fonctionnelle de macrophages via le récepteur Ly49B**

Nous avons ensuite tenté de déterminer quelles fonctions cellulaires sont inhibées suite à l'engagement du récepteur Ly49B. Comme les cellules qui expriment Ly49B sont majoritairement des granulocytes et des macrophages et que la phagocytose et la production de réactifs intermédiaires de l'oxygène sont deux de leurs fonctions principales, nous avons décidé d'analyser la capacité du récepteur Ly49B à les inhiber. La troisième fonction que nous avons étudiée est l'ADCC.

#### **3.10.1. Production de l'oxyde nitrique**

L'oxyde nitrique est relâché par les macrophages activés. Nous avons utilisé le LPS pour la stimulation. Nous avons tenté d'inhiber la relâche de NO par les macrophages via l'engagement du récepteur Ly49B avec l'anticorps 3LP218 ainsi qu'un deuxième anticorps anti-IgG de rat pour compléter le pontage. Quelle que soit la concentration de LPS utilisée pour l'activation ou la concentration des deux anticorps, dans aucun des cas nous n'avons pu observer une inhibition de la relâche de NO par la lignée cellulaire de macrophages RAW264.7. Une expérience représentative est illustrée à la figure 18. On peut voir que la présence ou non de l'anticorps 3LP218 n'a pas diminué la production de NO par les cellules activées par le LPS. De plus, en absence de LPS, on peut même noter une plus forte production de NO dans les conditions utilisées. Cette activation serait due au deuxième anticorps (anti-IgG de rat) que nous avons utilisé car nous avons observé un résultat similaire si l'anticorps anti-IgG de rat seulement était ajouté tandis que la production de NO était semblable au témoin négatif si seulement l'anticorps 3LP218 était



**Figure 18. Tentative d'inhibition de la production d'oxyde nitrique.**

La capacité du récepteur Ly49B à inhiber la relâche de NO par les cellules de la lignée de macrophages RAW264.7 a été évaluée avec la méthode de Griess. Les cellules ont été activées par le LPS durant 18 h. Les tentatives d'inhibition de l'activation des cellules a été faite en les incubant avec l'anticorps 3LP218 suivi par un deuxième anticorps de chèvre anti-IgG de rat. Sur l'histogramme, les conditions sans tentative d'inhibition sont présentées en blanc tandis que les conditions dans lesquelles nous avons tenté d'inhiber la production de NO sont présentées en noir. La densité optique (DO) mesurée augmente en fonction de la quantité de NO relâché dans le surnageant de culture. L'expérience présentée est un exemple représentatif de trois autres expériences similaires. Chaque condition a été faite en duplicata, les résultats présentés sont donc la moyenne des duplicatas.

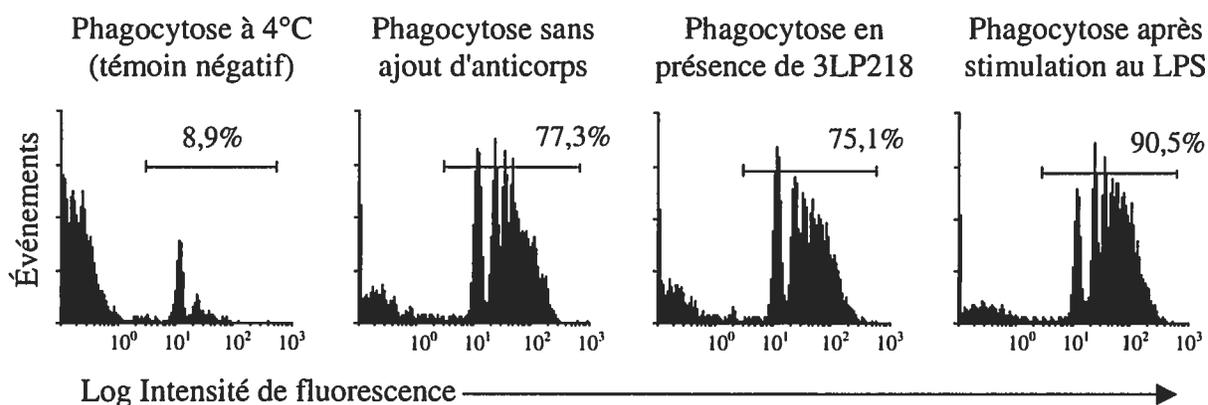
ajouté (résultats non illustrés). Suite à ces résultats négatifs, nous avons préincubé les cellules en présence d'IFN $\gamma$ . Sachant que cette cytokine permet la modulation à la hausse de l'expression du récepteur Ly49B, le signal d'inhibition aurait pu être plus important et atteindre le seuil requis pour qu'une baisse de la quantité de NO relâché par les macrophages puisse être détectée. Malgré un niveau d'expression plus élevé du récepteur Ly49B, aucun effet inhibiteur n'a été observé sur la production de NO, suite à l'engagement du récepteur avec l'anticorps 3LP218 (résultats non illustrés).

### **3.10.2. Phagocytose**

La deuxième fonction cellulaire que nous avons tenté d'inhiber est la phagocytose. Nous avons encore utilisé la lignée cellulaire RAW264.7 puisque les macrophages sont très efficaces pour la phagocytose. Le test a consisté à mettre les cellules en présence de billes de carboxylate fluorescentes pour différents temps d'incubations variant de 30 à 120 min à 37°C ou à 4°C dans le cas des témoins négatifs. Tel qu'illustré à la figure 19, à 4°C l'activité phagocytaire des cellules RAW264.7 est très faible. Par contre, après 60 min d'incubation à 37°C, environ 75% des cellules ont phagocyté au moins une bille. L'ajout de l'anticorps 3LP218 ainsi que d'un deuxième anticorps anti-IgG de rat n'a pas diminué l'efficacité de la phagocytose car le pourcentage mesuré de cellules ayant phagocyté une bille ou plus est sensiblement le même qu'en absence d'anticorps. La stimulation des cellules avec le LPS durant 18 heures avant le test a permis d'augmenter légèrement leur capacité à exercer la phagocytose. Toutefois, l'ajout de l'anticorps 3LP218 n'a pas eu d'effet sur cette condition non plus (non illustré). Le résultat illustré à la figure 19 est celui d'une incubation de 60 min avec une concentration de 25 billes par cellules. Pour tous les temps d'incubation testés, nous n'avons jamais observé d'inhibition de phagocytose suite à l'engagement du récepteur Ly49B par l'anticorps 3LP218.

### **3.10.3. ADCC**

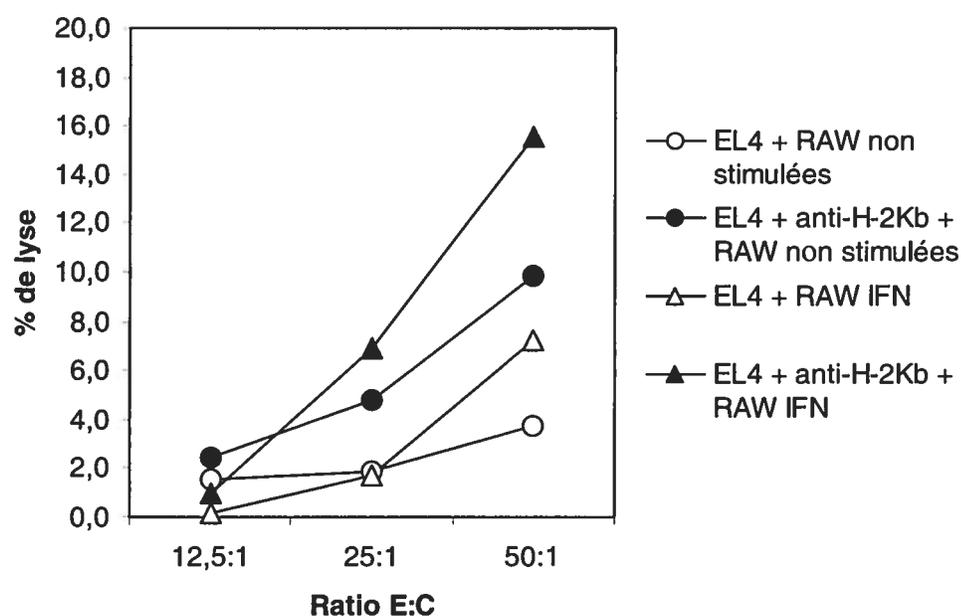
Plusieurs travaux ont montré que suite à leur engagement, les récepteurs Ly49 inhibiteurs peuvent empêcher la lyse de cellules cibles par les cellules NK. Il a aussi été



**Figure 19. Tentative d'inhibition de la phagocytose.**

La capacité du récepteur Ly49B à inhiber la phagocytose de billes de carboxylate fluorescentes a été évaluée en incubant les cellules RAW264.7 en présence de l'anticorps 3LP218 et d'un deuxième anticorps anti-IgG de rat. Les cellules ont ensuite été incubées 60 min en présence des billes (25 billes par cellules). L'analyse a été faite par cytométrie en flux en utilisant des billes fluorescentes. Chaque pic sur les histogrammes correspond à un nombre de billes phagocytées. Quatre expériences identiques ont été effectuées.

établi que la lyse de cellules enrobées d'anticorps (ADCC) peut être inhibée via les récepteurs Ly49 (Karlhofer, Ribaldo et Yokoyama, 1992; Correa, Corral et Raullet 1994). Nous avons donc tenté de voir si le récepteur Ly49B pouvait inhiber la même fonction chez des macrophages ou des granulocytes. La première lignée cellulaire que nous avons utilisée comme cellules cibles est la P815. Pour que ces cellules soient reconnues par les cellules effectrices, nous les avons préalablement incubées en présence d'un sérum polyclonal de souris anti-P815 qui a été produit dans notre laboratoire. Comme cellules effectrices, nous avons d'abord utilisé des cellules polymorphonucléaires isolées de la cavité péritonéale de souris BALB/c ou C3H quatre heures après stimulation au thioglycollate. Cette population cellulaire était donc composée principalement de granulocytes. La lyse mesurée des cellules cibles a été très faible, soit moins de 2% avec les granulocytes comme cellules effectrices, par contre la lyse était beaucoup plus importante dans le témoin positif dans lequel des cellules NK spléniques étaient utilisées, soit plus de 40% à un rapport cellules effectrices / cellules cibles (E:C) de 100:1 (résultats non illustrés). En raison de l'absence apparente de cytotoxicité des neutrophiles polymorphonucléaires contre les cellules P815, nous avons décidé d'utiliser les lignées de macrophages RAW264.7 et J774A.1 comme cellules effectrices. Encore une fois, très peu d'activité cytotoxique a été observée, ce qui nous a amenés à utiliser une autre lignée cellulaire comme cellule cible, soit la lignée EL4. Dans ce cas nous avons utilisé des anticorps contre des CMH-I pour provoquer l'ADCC, soit les anticorps AF6-88.5.3 (anti-H-2K<sup>b</sup>, ATCC) et B22.249 (anti-H-2D<sup>b</sup>, donné par le Dr U. Hämmerling du Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA). Encore une fois la cytotoxicité mesurée a été très faible avec les deux types de cellules effectrices. Même en prolongeant les temps d'incubation à 18 heures ou en stimulant les cellules effectrices par préculture à l'IFN $\gamma$ , le pourcentage maximal de cytotoxicité mesuré a été d'environ 15%. La figure 20 montre un exemple d'une expérience où des cellules RAW264.7 ont été utilisées comme cellules effectrices. Les cellules effectrices non stimulées à l'IFN $\gamma$  ont une faible activité cytotoxique puisqu'elles lysent moins de 10% des cellules cibles (EL4 enrobées d'anticorps anti-H-2K<sup>b</sup>) (ratio de 50:1). La lyse passe à environ 15% quand les mêmes cellules effectrices sont stimulées à l'IFN $\gamma$ . Ici encore, l'ajout de l'anticorps 3LP218 ne semble pas influencer les résultats. Aucune inhibition de l'activité cytotoxique des



**Figure 20. ADCC par des cellules RAW264.7 contre les cellules EL4.**

Les macrophages de la lignée RAW264.7 ont été utilisés comme cellules effectrices (E). Dans certaines conditions ils ont été pré-activés en présence d'IFN $\gamma$ . Les cellules cibles (C) sont des cellules de la lignée EL4 recouvertes par un anticorps reconnaissant les molécules H-2K<sup>b</sup> du CMH-I (clone AF6-88.5.3, ATCC). Les cellules ont été incubées 18 h avant que le surnageant soit prélevé et analysé à l'aide d'un appareil MicroBeta® TriLux pour déterminer la quantité de Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> relâché par les cellules cibles. Chaque condition a été testée en quadruplicata. Les résultats sont ceux d'une expérience représentative parmi toutes celles qui ont été effectuées.

cellules n'a pu être observée suite à l'engagement du récepteur Ly49B par l'anticorps 3LP218 (résultats non illustrés). Nous avons finalement utilisé la lignée C1498 comme cellule cible, sans toutefois obtenir une lyse plus importante (résultats non illustrés). La très faible activité cytotoxique dépendante des anticorps des polymorphonucléaires neutrophiles et des macrophages nous a alors convaincus que la poursuite de ces tests était peu pertinente.

Malgré le fait que nous ne sommes pas arrivés à inhiber une fonction précise par l'engagement du récepteur Ly49B avec l'anticorps 3LP218, celui-ci s'est tout de même avéré un outil remarquable pour nous aider à amorcer la caractérisation de l'expression et de la fonction de ce récepteur. Ainsi nous avons pu observer la distribution particulière de ce récepteur en comparaison avec les autres Ly49. Ly49B est exprimé par les cellules de la lignée myéloïde. La présence d'une séquence ITIM dans sa portion intracellulaire suggérait une fonction inhibitrice à cette protéine. Grâce à l'immunoprécipitation de Ly49B avec l'anticorps 3LP218, nous avons été en mesure d'observer le recrutement de la phosphatase SHP-1 par ce récepteur prouvant ainsi son potentiel inhibiteur. Bien des questions demeurent encore sans réponses à propos du récepteur Ly49B notamment l'identité de son ou ses ligands. Toutefois, il est évident que l'anticorps 3LP218 sera d'une aide précieuse pour trouver les réponses à ces questions.

## V. DISCUSSION

### 1. Expression comparée de récepteurs Ly49 inhibiteurs par les cellules NK et différentes sous-populations de cellules T et modulation par des cytokines

En utilisant des transfectants exprimant des niveaux variables du récepteur Ly49A, au moins deux équipes, dont la nôtre, ont établi que dans des conditions d'expression suffisante d'un ligand approprié sur la cellule cible, l'intensité du signal d'inhibition généré dans une cellule NK ou une cellule T dépend du niveau d'expression du récepteur Ly49A en surface cellulaire (Nakamura *et al.*, 1997; Chalifour *et al.*, 2003). Cet état de fait devrait vraisemblablement se répéter dans le cas des autres récepteurs Ly49 inhibiteurs, mais cela n'a toutefois pas encore été prouvé expérimentalement. Nous avons déjà mentionné dans les chapitres précédents que la caractérisation des propriétés fonctionnelles des récepteurs Ly49 est ralentie par de nombreux obstacles parmi lesquels il convient de rappeler la méconnaissance des ligands avec lesquels plusieurs de ces récepteurs interagissent et la non disponibilité d'une banque complète d'anticorps monoclonaux capables de reconnaître sélectivement chacun de ces récepteurs dont le niveau d'homologie est très élevé.

L'expression des récepteurs Ly49 par les cellules NK est plutôt bien documentée, mais au moment de débiter ce projet, peu de données étaient disponibles concernant leur expression par des lymphocytes T de même que leur régulation par des cytokines. Les rares études dans lesquelles cette question a été abordée ont surtout porté sur l'expression des récepteurs Ly49 sur les cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>. L'information ainsi produite est forcément incomplète puisqu'il est maintenant bien établi que les cellules CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> comprennent plusieurs sous-populations dont le rôle dans la réponse immunitaire diffère énormément (Godfrey *et al.*, 2000; Kronenberg et Gapin, 2002; MacDonald, 2002; Sharif *et al.*, 2002). L'objectif du premier volet de ce mémoire était d'abord de comparer l'expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs sur différentes sous-populations de lymphocytes T avec celle observée sur les cellules NK et d'évaluer ensuite si les profils

déterminés pouvaient varier après culture des cellules concernées en présence de diverses cytokines.

Des travaux antérieurs sur la différenciation des cellules NK et des lymphocytes T ont établi le rôle critique que jouent la molécule CD122 (IL-2/15R $\beta$ ) et la chaîne  $\gamma$ c dans l'acquisition des récepteurs Ly49 (Lantz *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1999). Ces deux molécules faisant partie du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15, il était clair que l'une et/ou l'autre de ces deux cytokines devait être impliquée dans ce processus. Bien qu'il ait été ultérieurement établi que l'IL-15 y participait davantage que l'IL-2, cette cytokine ne pouvait à elle seule initier l'expression de récepteurs Ly49 sur des précurseurs de cellules NK caractérisés par le phénotype NK1.1<sup>+</sup>IL-2/15R $\beta$ <sup>+</sup>Ly49<sup>-</sup> (Williams *et al.*, 2001). Dans la présente étude, nous nous étions fixé comme objectif de déterminer si l'IL-2 et l'IL-15 avaient la capacité de modifier les proportions relatives des cellules exprimant des récepteurs Ly49 inhibiteurs au sein de différentes sous-populations de lymphocytes T spléniques matures et de faire varier en surface cellulaire le niveau d'expression des récepteurs concernés. Bien que l'analyse ait été effectuée tel que prévu, nous n'avons pas fait état dans ce mémoire des résultats de la modulation des récepteurs Ly49 sur les cellules CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>NK1<sup>+</sup> par des cytokines. La fréquence de ces cellules après culture était trop faible pour valider les observations. Par conséquent, seuls les résultats obtenus avec la population T CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> DN seront discutés. Les cellules NK dont le phénotype est bien connu ont servi de population de référence pour valider les mesures avec les anticorps monoclonaux que nous avons utilisés. De plus, en raison du rôle déterminant que joue l'IL-12 (Smyth *et al.*, 2002) dans l'activation des cellules NK et NKT, dont une grande proportion sont CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> DN, nous avons cru bon d'ajouter cette cytokine à notre étude.

Nos résultats illustrent bien que des différences phénotypiques existent déjà à la base entre les populations cellulaires que nous avons étudiées. Les pourcentages de cellules NK exprimant les récepteurs Ly49A, Ly49C/I et Ly49G2 que nous avons mesurés sont comparables à ceux rapportés par Kubota *et al.*, (1999a) et corroborent des données déjà rapportées par notre équipe (Depatie *et al.*, 1999). L'anticorps 4D11 utilisé

par Kubota *et al.*, (1999a) pour dénombrer les cellules Ly49G2<sup>+</sup> réagit de façon croisée avec le récepteur Ly49A (Takei, Brennan et Mager., 1997) alors que l'anticorps 4LO439 que nous avons utilisé réagit spécifiquement avec Ly49G2 (Depatie *et al.*, 1999). Puisque près de la moitié des cellules NK dans lesquelles de l'ARNm de Ly49A a été décelé n'avait pas d'ARNm pour Ly49G2 (Takei *et al.*, 2001), nous anticipions un taux supérieur de cellules NK 4D11<sup>+</sup> que de cellules NK 4LO439<sup>+</sup>, ce qui n'a pas été le cas (Kubota *et al.*, 1999a et résultats non illustrés). Ce résultat inattendu pourrait s'expliquer par une affinité plus faible de 4D11 pour Ly49A que pour Ly49G2 ou encore par une expression en surface cellulaire de Ly49A qui ne soit pas en corrélation avec la présence d'ARNm. Les études de Kubota *et al.*, (1999a) supportent partiellement cette interprétation. La fréquence des cellules NK exprimant Ly49C est semblable à ce que nous avons déjà rapportée pour la souris C57BL/6 (Depatie *et al.*, 1999).

Au sein de la population CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>, nous observons une fréquence plus grande de cellules Ly49A<sup>+</sup> et de cellules Ly49G2<sup>+</sup> parmi les cellules T DN que parmi les cellules CD4<sup>+</sup>. La fréquence des cellules T DN exprimant l'un ou l'autre de ces récepteurs est sensiblement la même alors qu'il y a près de deux fois plus de cellules Ly49G2<sup>+</sup> que de cellules Ly49A<sup>+</sup> parmi les cellules NK. Ces résultats appuient les observations de Sköld et Cardell (2000) qui ont analysé l'expression des récepteurs Ly49A, Ly49C/I et Ly49G2 sur les cellules TCRαβ<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> de plusieurs organes dont la rate. Cependant, le protocole d'enrichissement que nous avons utilisé et l'analyse d'un grand nombre d'évènements en cytométrie en flux permettent une meilleure détection des cellules CD4<sup>+</sup>Ly49<sup>+</sup>. Les procédures d'enrichissement que nous avons utilisées n'altèrent apparemment pas la distribution cellulaire puisque la fréquence relative des cellules Ly49A<sup>+</sup> que nous avons mesurée au sein des populations T DN, CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est comparable aux résultats rapportés par Eberl *et al.*, (1999) dont l'analyse a été faite sur des suspensions de cellules spléniques non enrichies. Malheureusement, ces auteurs n'ont suivi aucun autre récepteur Ly49 dans leur analyse de telle sorte que nous ne disposons d'aucune autre valeur de référence.

Selon nos observations, le récepteur Ly49G2 serait le récepteur Ly49 inhibiteur le plus fréquemment exprimé sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Nous avons en effet observé que près de 80% des cellules CD8<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> exprimaient ce récepteur. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Coles *et al.*, (2000) à tout le moins en ce qui a trait à l'expression relative des récepteurs Ly49A, Ly49C/I et Ly49G2 sur les cellules T spléniques CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, ces auteurs rapportent que la fréquence des cellules T CD8<sup>+</sup> exprimant le récepteur Ly49F serait encore plus grande. Ce récepteur inhibiteur n'a pas été considéré dans notre étude parce que sa présence sur les cellules NK matures était négligeable (Kubota *et al.*, 1999a; Takei *et al.*, 2001).

Toutes les populations de cellules T que nous avons étudiées contenaient des taux de cellules Ly49C<sup>+</sup> bien inférieurs à ce que nous avons observé pour les cellules NK. Il s'agit d'une observation inédite puisque personne n'avait encore étudié ces populations avec un anticorps qui soit spécifique à ce seul récepteur. Les résultats vont dans le même sens pour les analyses faites avec l'anticorps 5GA5 qui détecte un épitope commun à Ly49C et Ly49I, deux récepteurs qui présentent une homologie de séquence nucléotidique de l'ordre de 95,9% (Makrigiannis *et al.*, 2002). Le taux de cellules Ly49C/I<sup>+</sup> que nous avons observé parmi les cellules T DN est légèrement supérieur à celui rapporté par Sköld et Cardell (2000), mais nous trouvons par ailleurs des valeurs identiques pour les cellules T DN et pour les cellules T CD4<sup>+</sup> alors que ces auteurs identifient à peine 3% de cellules T CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> qui soient Ly49C/I<sup>+</sup>. Les valeurs plus élevées que nous mesurons pour les cellules exprimant Ly49C/I sont explicables par le fait que l'anticorps 5GA5 que nous avons utilisé semble avoir une plus forte affinité pour le récepteur Ly49C si on le compare à l'anticorps SW5E6 (observations non publiées faites par notre laboratoire). Il est donc probable qu'une partie des cellules Ly49C<sup>+</sup> ne sont donc pas détectées par SW5E6, cela expliquerait donc les plus faibles taux de cellules positives mesurés par Sköld et Cardell. De plus, il faut rappeler qu'il est nécessaire d'analyser un très grand nombre d'événements pour les cellules CD4<sup>+</sup> pour que les résultats soient valides.

En bref, les fréquences de cellules positives que nous avons observées sur les cellules NK confirment la grande stabilité des réactifs que nous avons utilisés puisque nos données sont semblables à ce que notre équipe a rapporté plusieurs années auparavant (Depatie *et al.*, 1999). L'identité de nos observations avec celles de Eberl *et al.*, (1999) pour le récepteur Ly49A valide notre méthodologie pour l'analyse des sous-populations de lymphocytes T. Les variations de fréquences relatives de cellules exprimant des récepteurs Ly49 au sein des différentes populations analysées suggèrent une régulation différentielle selon le type cellulaire et le récepteur concerné.

Après culture des cellules en présence d'IL-2 ou d'IL-15, on note une augmentation significative de la fréquence des cellules T NK1.1<sup>+</sup> DN exprimant les récepteurs Ly49C ou Ly49G2, un phénomène qui ne s'observe pas pour les cellules NK. Il y a par contre une diminution des cellules NK exprimant l'épitope commun aux récepteurs Ly49C et Ly49I. Comme il n'y a pas de changement dans les cellules NK Ly49C<sup>+</sup> on peut présumer que c'est la population Ly49I<sup>+</sup> qui a diminué. Par ailleurs, comme il y a augmentation des cellules T NK1.1<sup>+</sup> DN Ly49C<sup>+</sup> et pas de changement dans la fréquence relative des cellules Ly49C/I<sup>+</sup> dans cette population, nous faisons l'hypothèse qu'il y a eu diminution proportionnelle de la population Ly49I<sup>+</sup> et que les effets opposés s'annulent tout simplement.

En ce qui a trait à l'expression des récepteurs après culture en présence d'IL-2 ou d'IL-15, l'observation la plus marquante est l'augmentation importante du niveau d'expression de Ly49G2 sur les T DN comme sur les cellules NK. Il y a également augmentation du niveau du récepteur Ly49C sur les deux types de cellules, mais dans ce cas-ci l'effet est trois fois plus important sur les cellules T DN.

L'IL-15 contribue au développement, à la survie et à l'activité fonctionnelle des cellules NK et NKT de même qu'au maintien des cellules T CD8<sup>+</sup> mémoire (Ohteki, 2002). Parce que l'IL-15 et l'IL-2 partagent deux des trois chaînes de leur récepteur respectif, il n'est pas étonnant que dans une culture cellulaire en présence d'une forte dose d'IL-2, les effets dus à l'IL-15 puissent être reproduits.

Puisque Ly49C est le seul récepteur inhibiteur de notre étude à avoir un ligand de haute affinité chez la souris C57BL/6, en l'occurrence H-2K<sup>b</sup>, la fréquence plus grande des cellules T NK1.1<sup>+</sup> DN exprimant Ly49C observée après culture en présence d'IL-15 pourrait être l'indice d'une survie préférentielle de ces cellules protégées de l'apoptose induite par leur activation via leur TCR à l'image de ce que nous avons rapporté à l'aide de transfectants Ly49A<sup>+</sup> (Roger *et al.*, 2002). La tendance à la hausse du niveau d'expression de Ly49C, et ce davantage sur les lymphocytes T NK1.1<sup>+</sup> DN que sur les cellules NK, irait dans le même sens.

Dans le cadre d'une étude effectuée en collaboration avec l'équipe de F. Takei (Terry Fox laboratory, Vancouver, CB, Canada) notre équipe a établi que les allèles des récepteurs Ly49C et Ly49I exprimés chez la souris C57BL/6 diffèrent par 22 acides aminés dont 14 sont situés dans la portion extracellulaire des récepteurs (Brennan *et al.*, 1996). De tous les récepteurs Ly49, Ly49C et Ly49I sont ceux qui se lient à la plus grande variété de ligands (Hanke *et al.*, 1999). Cependant, des différences à 14 positions de la portion extracellulaire du récepteur devraient se manifester par des affinités variables pour leurs différents ligands. En comparant l'adhésion de cellules COS transfectées avec l'ADNc de Ly49C ou Ly49I sur des cellules RBL-1 transfectées avec des ADNc de différentes molécules de classe I du CMH, Lian *et al.*, (1999) ont démontré que l'adhésion des transfectants Ly49I<sup>+</sup> était en général 6 fois inférieure à celle des transfectants Ly49C<sup>+</sup>. À l'aide de souris transgéniques FVB.Ly49I, la fonctionnalité de la liaison Ly49I/H-2K<sup>b</sup> a tout de même pu être confirmée par la démonstration que cette liaison prévient le rejet de cellules de moelle osseuse H-2K<sup>b</sup> (Morris *et al.*, 2002a). Toutefois, le fait que cette liaison soit incapable de prévenir la prolifération de lymphocytes T dans un contexte d'allostimulation démontre que contrairement à ce qui a été rapporté pour des souris transgéniques exprimant les récepteurs Ly49A ou Ly49G2, l'interaction Ly49I/H-2<sup>b</sup> serait peu efficace ou de faible affinité (Morris *et al.*, 2002b). Ces observations suggèrent une piste qui permette de comprendre pourquoi dans le contexte de notre étude et après culture en présence d'IL-15, il y aurait avantage sélectif pour la population des lymphocytes T NK1.1<sup>+</sup> DN exprimant Ly49C, mais non pour celle exprimant Ly49I.

Le récepteur Ly49A n'a pas de ligand fonctionnel chez la souris C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) (Chalifour *et al.*, 2003). Dès lors il n'est pas étonnant de constater que la taille des populations NK et T NK1.1<sup>+</sup> DN n'est pas modifiée après culture en présence d'IL-2 ou d'IL-15 et que le niveau du récepteur n'est pas modulé non plus significativement. Par ailleurs, comment expliquer l'augmentation significative de la population T NK1.1<sup>+</sup> DN qui exprime Ly49G2 et l'augmentation significative de la densité de ce récepteur sur les cellules NK et T NK.1.1<sup>+</sup> DN puisque à l'instar de Ly49A, ce récepteur n'a pas de ligand H-2<sup>b</sup>? Rappelons que notre équipe avait déjà rapporté l'augmentation sélective du niveau d'expression de Ly49G2 sur les cellules NK1.1<sup>+</sup> suite à l'infection de souris C57BL/6 avec le cytomégalovirus murin (Depatie *et al.*, 1999). Les hypothèses les plus plausibles pour expliquer nos résultats pourraient être une régulation transcriptionnelle particulière de Ly49G2, dépendante de l'activation via l'une ou l'autre ou les deux chaînes partagées par le récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15 ou encore l'existence d'un ligand inductible apparu suite à l'activation via IL-2/15R. La première hypothèse est appuyée par le fait que des différences ont été rapportées en ce qui a trait à l'expression des récepteurs Ly49A et Ly49G2 chez des souris déficientes pour les facteurs de transcription TCF-1 (Held *et al.*, 1999b) et PU.1 (Colucci *et al.*, 2001). Comment cela pourrait être relié à nos observations reste toutefois à investiguer. Quant à l'existence d'un ligand inductible, un tel état de fait est bien établi pour NKG2D, un récepteur d'activation présent non seulement sur les cellules NK et des lymphocytes T, mais également sur des cellules dendritiques et des macrophages activés (Jamieson *et al.*, 2002). Si un tel ligand inductible pour Ly49G2 était présent après stimulation des cellules avec l'IL-2 ou l'IL-15, il pourrait favoriser la survie de la population T NK1.1<sup>+</sup> DN Ly49G2<sup>+</sup> de la même manière que ce que nous avons invoqué pour la population Ly49C<sup>+</sup>.

Nous n'avons obtenu aucun effet mesurable dans les cultures contenant de l'IL-12. Le rôle de cette cytokine est surtout d'augmenter la production d'IFN $\gamma$  notamment par les cellules NK, les cellules NKT et les lymphocytes Th1 (Trinchieri, 2003). Selon nos observations, cet effet ne s'accompagnerait pas d'une modulation des récepteurs Ly49 ni d'une prolifération sélective des cellules NK ou T NK1.1<sup>+</sup> DN exprimant l'un ou l'autre des récepteurs à l'étude. Rappelons que des travaux ont déjà suggéré que l'activité

cytotoxique et la production d'IFN $\gamma$  par les cellules NK seraient régulées différemment (Kubota *et al.*, 1999b).

En conclusion, la modulation par l'IL-15 ou par l'IL-2 de l'expression des récepteurs Ly49 et le contrôle de la taille relative des populations cellulaires qui les expriment ne s'appliquent pas de façon uniforme pour tous les récepteurs Ly49. Dans le cas des lymphocytes T NK1.1<sup>+</sup> DN, la présence d'un ligand de haute affinité sur les cellules présentes dans l'environnement immédiat des cellules étudiées donnerait un avantage sélectif à la population concernée. De plus, certaines de nos observations supportent soit une régulation transcriptionnelle particulière pour le récepteur Ly49G2 ou l'existence d'un ligand inductible. Enfin, contrairement à ce qui a été observé chez l'humain pour au moins deux autres récepteurs apparentés aux lectines de type C et dont l'expression est favorisée après culture en présence d'IL-12 (Poggi *et al.*, 1998; Azzoni *et al.*, 1998; Derre *et al.*, 2002), celle-ci n'affecte en rien l'expression des récepteurs Ly49. L'insuffisance de récepteurs IL-12R sur les cellules étudiées peut difficilement être invoquée car les conditions expérimentales que nous avons utilisées impliquaient une pré-incubation avec l'IL-2 qui accroît précisément l'expression de IL-12R (Wang *et al.*, 2000).

## **2. Propriétés du récepteur Ly49B**

Ly49B demeurerait jusqu'à ce jour un récepteur très intrigant et pourtant méconnu. Nous avons réussi à produire un anticorps monoclonal qui lui est spécifique et qui s'est avéré un outil très précieux qui nous a permis d'amorcer la caractérisation de l'expression et des propriétés fonctionnelles de ce récepteur.

La sélection d'un hybridome produisant un anticorps monoclonal spécifique pour le récepteur Ly49B est la première à être rapportée. Le fait que l'anticorps 3LP218 ne reconnaisse pas les transfectants JA et JC et qu'il ne réagisse pas avec la très grande majorité de la population lymphocytaire de la rate des souris BALB/c et C57BL/6 supporte solidement l'hypothèse qu'il ne possède pas de réactivité croisée envers les autres récepteurs Ly49 exprimés chez ces deux souches de souris. Toutefois, la non

réactivité de l'anticorps avec des transfectants exprimant les autres récepteurs Ly49 serait la preuve absolue de sa spécificité envers Ly49B, cette expérience reste à être réalisée. L'utilisation de ce nouvel anticorps nous a permis de démontrer que l'expression du récepteur Ly49B est très différente de celles des autres récepteurs de cette famille. D'abord, l'absence ou la très faible expression de Ly49B par les cellules NK confirme les travaux présentés par Takei et collaborateurs (2001) qui n'avaient pas détecté l'ARNm du récepteur Ly49B en analysant 80 cellules NK individuellement. Toutefois, dans une étude préalable, cet ARNm avait été détecté suite à l'analyse d'un groupe de 1000 cellules NK (Kubota *et al.*, 1999a). Kubota et collaborateurs ont obtenu leurs cellules NK en triant les cellules NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> par cytométrie en flux à partir de la population de cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon. Or, selon nos résultats (non illustrés), des cellules de la lignée myéloïde exprimant le récepteur Ly49B sont présentes dans la suspension de cellules spléniques non adhérentes à la laine de nylon. Puisque la purification de cellules par tri à l'aide d'un cytofluoromètre est rarement efficace à 100%, il serait donc possible que des cellules de la lignée myéloïde aient été présentes dans la population enrichie en cellules NK que Kubota et collaborateurs ont analysée. La présence d'ARNm du récepteur Ly49B qui a été détecté pourrait donc provenir de ces cellules myéloïdes. Néanmoins, nous n'excluons pas la possibilité que le récepteur Ly49B soit réellement exprimé par une très faible proportion de cellules NK.

La même équipe avait aussi rapporté la présence d'ARNm du récepteur Ly49B dans des précurseurs de cellules NK isolés de la moelle osseuse et cultivés en présence d'un mélange de cytokines (Williams *et al.*, 2000). Dans ces conditions expérimentales, Ly49B serait exprimé par une proportion non négligeable de ces cellules car l'ARNm a été détecté en analysant une suspension contenant aussi peu que 10 cellules. Dans la moelle osseuse, la protéine c-Kit (CD117) est exprimée par les précurseurs hématopoïétiques. Le double marquage des cellules de la moelle osseuse avec les anticorps anti-CD117 et anti-Ly49B indique que le récepteur Ly49B ne semble à peu près pas exprimé par ces cellules lorsqu'elles sont fraîchement isolées. Toutefois, il faut noter que nous n'avons pas travaillé avec une population enrichie pour les cellules exprimant le marqueur CD117. Nous n'avons donc pas optimisé les chances d'observer des cellules

CD117<sup>+</sup>Ly49B<sup>+</sup>. Il est quand même possible que l'expression importante du récepteur Ly49B par les précurseurs de cellules NK n'apparaisse qu'*in vitro*. Une répétition de ces expériences de culture pourrait toutefois être pertinente car la détection de l'ARNm d'une protéine ne prouve pas qu'elle est nécessairement exprimée à la surface de la cellule. La détection du récepteur Ly49B avec l'anticorps 3LP218 sur ces cellules cultivées permettrait alors d'éclaircir la situation.

L'anticorps 3LP218 nous a permis d'établir l'expression particulière du récepteur Ly49B par les cellules de la lignée myéloïde. C'est la première fois qu'est rapportée l'expression d'un récepteur Ly49 sur des cellules autres que celles de la lignée lymphoïde. Cette observation laisse supposer que la régulation du gène *Ly49b* se fait probablement différemment de celle des autres gènes *Ly49*, ce qui serait logique puisque parmi *Ly49a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *g*, *h*, *i* et *j*, ce sont les gènes *Ly49b* et *Ly49h* qui possèdent les séquences d'acides nucléiques les plus différentes dans la région de leurs promoteurs (Wilhelm *et al.*, 2001). L'expression de *Ly49b* pourrait être régulée par des facteurs de transcription présents dans les cellules de la lignée myéloïde, mais pas dans les cellules NK et les lymphocytes T. De plus, considérant la localisation chromosomique du gène *Ly49b* qui se retrouve isolé des autres gènes *Ly49* dans le NKC, l'expression de *Ly49b* pourrait être régulée différemment des autres gènes de cette famille.

Une comparaison de l'expression du récepteur Ly49B avec d'autres récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules myéloïdes tels que PIR-B et gp49B montre que Ly49B est exprimé par une proportion plus faible de cellules dans la moelle osseuse. En effet, l'anticorps 3LP218 ne réagit qu'avec le quart des cellules de la moelle osseuse. L'anticorps 6C1 qui reconnaît un épitope commun aux récepteurs antagonistes PIR-A et PIR-B réagit avec 80% des cellules dans la moelle osseuse (Kubawaga *et al.*, 1999). Tous les types cellulaires qui se sont avérés positifs pour la présence de l'ARNm de PIR-A ont aussi de l'ARNm de PIR-B (Kubawaga, Burrows et Cooper, 1997), ce qui suggère que les 80% de cellules détectées par l'anticorps 6C1 coexpriment ces deux récepteurs. Alors que le récepteur Ly49B est retrouvé presque exclusivement chez les monocytes/macrophages et les granulocytes, le récepteur PIR-B est aussi exprimé par une proportion importante de

lymphocytes B, de mastocytes et de cellules dendritiques, ce qui explique sa plus forte réactivité dans la moelle osseuse. Donc, bien que PIR-B et Ly49B aient une fonction inhibitrice, leurs propriétés d'expression différentes indiquent qu'ils interviennent probablement à des niveaux différents dans la régulation de l'activité cellulaire.

Le récepteur inhibiteur gp49B, quant à lui, peut être détecté avec l'anticorps H1.1. Toutefois, cet anticorps réagit aussi avec le récepteur activateur gp49A. Cet anticorps marque environ 60% des cellules de la moelle osseuse (Wang *et al.*, 2000). Il n'a pas été établi si les cellules positives coexpriment les deux récepteurs à la fois. Cela suggère tout de même que le récepteur gp49B est exprimé par une proportion importante des monocytes/macrophages et des granulocytes, tout comme c'est le cas pour Ly49B. L'expression du récepteur Ly49B se rapprocherait donc plus de celle de gp49B que de celle de PIR-B.

L'absence de réactivité de l'anticorps 3LP218 avec des cellules de moelle osseuse des souris C57BL/6 et 129 lors des analyses par cytométrie en flux nous a d'abord fait croire à une spécificité allélique de l'anticorps. Ces deux souches expriment un allèle de *Ly49b* codant une protéine dont la séquence varie par une dizaine d'acides aminés de celle exprimée par la souche BALB/c (séquences disponibles dans la base de donnée du NCBI). De plus, la détection de cellules Ly49B<sup>+</sup> chez les souches C3H et DBA/2 est venue mettre du poids à cette hypothèse car bien que la séquence exacte des gènes *Ly49b* de ces deux souches ne soit pas connue, une étude récente indique qu'ils seraient apparentés à l'allèle présent chez BALB/c (Lee *et al.*, 2001b). Les résultats des tests d'immunoprécipitation avec l'anticorps 3LP218 confirment les résultats de cytométrie, soit que l'anticorps ne détecte pas Ly49B chez la souris C57BL/6. Par contre, pour les cellules de moelle osseuse de BALB/c, les cellules JB et la lignée de macrophages RAW264.7, le récepteur Ly49B y est exprimé sous la forme d'un homodimère d'une masse moléculaire d'environ 90 kDa. Ly49B n'est donc pas différent des autres membres de la famille Ly49 en fonction de la taille et de la structure de la protéine. La spécificité allélique de l'anticorps 3LP218 pourrait donc expliquer pourquoi Ly49B est détecté chez les souris BALB/c, C3H et DBA/2 mais pas chez les souches C57BL/6 et 129. Une autre

possibilité serait que l'anticorps reconnaisse la protéine Ly49B exprimée chez la souris C57BL/6 mais que son niveau d'expression soit trop faible pour être détecté. D'ailleurs, les analyses par cytométrie en flux faites sur des cellules de souris BALB/c montrent bien que le récepteur Ly49B est faiblement exprimé par les cellules de moelle osseuse et celles de la cavité péritonéale. Les valeurs des MFI mesurées varient entre 4 et 12, ce qui est relativement faible si on tient compte que la protéine est détectée avec un anticorps biotinylé révélé avec un conjugué de fluorochromes PE-Cy5 (Streptavidine-Cy-Chrome™) qui permet normalement une forte émission de lumière quand la protéine est fortement exprimée (Shapiro, 1998). À titre de comparaison, l'analyse des transfectants JB, dans les mêmes conditions, révèle une valeur de MFI variant entre 50 et 60. Une autre preuve de la faible expression de Ly49B sur les cellules de BALB/c est que l'anticorps 3LP218 ne peut détecter Ly49B s'il est couplé au FITC, tandis que les cellules JB positives sont facilement visibles avec le même anticorps (résultats non illustrés). Le FITC est un fluorochrome beaucoup moins performant que le conjugué PE-Cy5. Les protéines faiblement exprimées sont donc plus difficilement détectables par cytométrie en flux avec un anticorps conjugué au FITC (Shapiro, 1988).

En bref, Ly49B est faiblement exprimé par les cellules de souris BALB/c, mais suffisamment pour que sa détection par cytométrie en flux soit possible, tandis que cette protéine pourrait être exprimée de façon encore plus faible chez les cellules de souris C57BL/6, ce qui la rendrait indétectable par la même méthode d'analyse. Pour prouver hors de tous doutes l'expression du récepteur Ly49B par des cellules de souris C57BL/6 ou pour prouver la spécificité allélique de l'anticorps, nous aurions pu prendre avantage du fait que l'expression de cette protéine peut être modulée à la hausse de façon importante, notamment par l'IFN $\gamma$ . Nous n'avons malheureusement pas de lignée cellulaire de macrophages ou de granulocytes issues de la souris C57BL/6 pour faire ce test. Cela demeure une expérience qui sera intéressante à réaliser pour la suite du projet.

La comparaison du profil d'expression du récepteur Ly49B par les cellules des cinq souches de souris testées démontre que cette protéine est exprimée de façon plus intense chez les souris exprimant les molécules de CMH-I H-2<sup>d</sup> (BALB/c et DBA/2) et H-

2<sup>k</sup> (C3H) et plus faible ou peut-être nulle chez les souris H-2<sup>b</sup> (C57BL/6 et 129). Puisque l'expression des autres récepteurs Ly49 est modulée à la baisse quand le ligand est présent, il est probable que ce soit la même situation avec le récepteur Ly49B. La très faible expression du récepteur Ly49B que nous observons chez les souris exprimant les molécules H-2<sup>b</sup> pourrait laisser croire que son ligand serait une molécule de cet haplotype. Toutefois la spécificité allélique de l'anticorps pourrait aussi expliquer pourquoi Ly49B n'est pas détecté chez ces deux souches. De plus, des tests d'adhésions utilisant des cellules transfectées exprimant Ly49B ainsi que des tentatives de marquage de ces cellules avec des tétramères de molécules de CMH-I ont déjà établi la non réactivité de Ly49B avec les membres de la famille de molécules H-2<sup>b</sup> (Hanke *et al.*, 1999). Selon ces observations, il serait donc peu probable que le ligand de Ly49B soit une molécule H-2<sup>b</sup>. Cependant, il faut noter que les transfectants utilisés par Hanke et collaborateurs sont des transfectants transitoires dont le niveau d'expression du récepteur Ly49B pourrait être insuffisant pour permettre de visualiser l'adhésion de cellules exprimant un ligand de faible affinité. De plus, Ly49B n'était pas exprimé par la totalité de la population de transfectants transitoires, ce qui pourrait aussi avoir nuit à l'identification d'un ligand de faible affinité. Nos résultats montrent que l'expression du récepteur Ly49B est modulée à la hausse de façon importante par l'IFN $\gamma$ , le LPS et le Poly I:C. Sachant que le niveau d'expression d'un récepteur peut influencer sa capacité à induire un signal d'inhibition, il est possible que le récepteur Ly49B exige un haut niveau d'expression pour qu'il puisse se lier efficacement avec son ligand. Puisque nous avons des transfectants stables exprimant un haut niveau de Ly49B, il serait intéressant de reprendre des tests d'adhésion avec nos transfectants. Le haut niveau d'expression du récepteur Ly49B par les cellules JB pourrait ainsi maximiser les chances de trouver des cellules exprimant un ligand de ce récepteur.

L'identité du ligand de Ly49B est intrigante. Il pourrait être une molécule de classe I du CMH ou une molécule apparentée, comme c'est le cas pour les autres récepteurs Ly49. Toutefois, certaines caractéristiques du récepteur Ly49B laissent envisager la possibilité que son ligand serait d'une autre nature. Par exemple, rappelons que le CRD du récepteur Ly49B a un prolongement de 20 acides aminés qui n'est pas

retrouvé chez aucun autre récepteur Ly49. Cette séquence unique d'acides aminés est peut-être importante pour la reconnaissance du ligand. De plus, Ly49H reconnaît un ligand d'origine virale. Puisque *Ly49h* est le gène dont la séquence du promoteur présente le plus d'homologie avec celle de *Ly49b* (Wilhelm *et al.*, 2001), il ne faut pas exclure la possibilité d'un ligand exogène reconnu par Ly49B. Dans ce cas, la fonction de ce récepteur serait peut-être d'éviter une trop forte réponse immunitaire qui pourrait s'avérer dommageable pour l'organisme. Une autre possibilité serait que le récepteur Ly49B reconnaisse un ligand dont l'expression serait modulée à la hausse dans certaines conditions comme lors d'une infection virale. Si l'expression de Ly49B peut être modulée, il ne faut pas négliger l'idée que son ligand puisse l'être lui aussi. Un fait qui appuie l'hypothèse que le récepteur Ly49B pourrait reconnaître une molécule qui n'est pas apparenté à celles des CMH est que le récepteur d'inhibition gp49B1 reconnaît l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Castells *et al.*, 2001). Bien que ce récepteur qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines ne présente pas d'homologie structurale avec le récepteur Ly49B, cela prouve néanmoins que les ligands reconnus par les récepteurs inhibiteurs ne sont pas uniquement des molécules du CMH. Rappelons que la liaison à un ligand viral a aussi été établie pour le récepteur inhibiteur Ly49I exprimé chez la souris 129 (Arase *et al.*, 2002)

Les résultats des immunoprécipitations sont clairs, Ly49B peut bel et bien recruter la phosphatase SHP-1, ce qui prouve son potentiel inhibiteur. Sur le plan fonctionnel, Ly49B n'est donc pas différent des récepteurs PIR-B (Bléry *et al.*, 1998) et gp49B (Wang *et al.*, 1999), de même que des autres récepteurs Ly49 qui peuvent eux aussi recruter la phosphatase SHP-1 pour enclencher un signal d'inhibition (Anderson, Ortaldo et McVicar, 2001).

Nous avons utilisé l'anticorps 3LP218 pour engager le récepteur Ly49B exprimé à la surface des cellules utilisées dans les différents tests d'activité fonctionnelle. Nous avons tenté de déterminer quelle fonction précise le récepteur Ly49B peut inhiber. Nous en avons ciblé trois, soit la production de NO, la phagocytose et l'ADCC. Les deux premières font parties des activités principales des cellules granulocytes/macrophages. De plus, la flambée oxydative est une des fonctions favorisées chez des cellules de la lignée

myéloïde exprimant un dominant négatif de la protéine SHP-1 (Dong *et al.*, 1999). Si le récepteur Ly49B a une fonction régulatrice importante chez ces cellules, la phagocytose et la production de NO sont donc des candidates logiques qui pourraient être régulées via Ly49B. La troisième fonction que nous avons testée, l'ADCC, n'est pas reconnue pour être une fonction majeure des cellules granulocytes/macrophages mais elles en ont tout de même la capacité (Ralph et Ninkovic, 1977) et elle peut être inhibée via le récepteur FcγRIIB (Clynes *et al.*, 2000). De plus, la cytotoxicité est la fonction la plus facilement inhibée chez les cellules NK via les récepteurs Ly49 (Correa, Corral et Raulat, 1994). Toutefois, l'ADCC que nous avons mesuré n'était pas assez importante pour que nous puissions tenter de l'inhiber via le récepteur Ly49B. Il faudrait donc trouver de meilleures conditions d'induction d'ADCC pour pouvoir reprendre les analyses relatives au coengagement du récepteur Ly49B. L'expression simultanée des récepteurs FcγRIIB (inhibiteur) et FcγRIIA (activateur) n'est pas sans compliquer l'étude. Malheureusement, il est difficile de bloquer simplement FcγRIIB car les anticorps contre ce récepteur réagissent aussi contre FcγRIIA qui a 95% d'homologie dans sa portion extracellulaire (Ravetch et Kinoshita, 1991). Des granulocytes ou des macrophages péritonéaux de souris FcγRIIB<sup>-/-</sup> pourraient être utiles pour élucider le rôle de Ly49B dans l'inhibition de l'ADCC.

Les tests de production du NO et de phagocytose ont quant à eux très bien fonctionné. Par contre, lorsque nous avons tenté d'inhiber ces fonctions via le récepteur Ly49B, nous n'avons observé aucune inhibition. Dans le cas de la phagocytose il a pourtant été établi que cette fonction peut être inhibée par le récepteur FcγRIIB via la phosphatase SHP-1 (Hunter *et al.*, 1998; Kant *et al.*, 2002). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Celle qui s'impose d'emblée est que l'anticorps 3LP218 ne peut pas agir comme agoniste du ligand naturel du récepteur Ly49B; celui-ci reconnaîtrait alors un épitope qui n'intervient pas dans l'activité fonctionnelle du récepteur. Une deuxième hypothèse serait que le récepteur Ly49B n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activation des cellules par le LPS ou l'IFNγ. Il ne faut pas oublier qu'un récepteur inhibiteur sera actif seulement s'il est coengagé avec un récepteur d'activation. Un récepteur inhibiteur donné ne va pas nécessairement pouvoir bloquer les activations

enclenchées par n'importe quel récepteur activateur. Donc dans ce cas-ci, le récepteur Ly49B ne serait pas en mesure de contrer les signaux d'activation générés par les récepteurs du LPS ou de l'IFN $\gamma$ . La validité de cette hypothèse serait toutefois surprenante car les résultats montrent bien que l'expression du récepteur Ly49B est beaucoup plus importante quand les cellules sont stimulées avec le LPS ou l'IFN $\gamma$ . Donc s'il existe un lien entre les récepteurs de ces deux molécules et l'expression du récepteur Ly49B, il serait logique que celui-ci puisse à son tour inhiber l'effet des deux récepteurs précédents pour éviter la suractivation des cellules. La troisième hypothèse pouvant expliquer l'échec des tests d'inhibition serait que le récepteur Ly49B ne puisse tout simplement pas inhiber les fonctions que nous avons testées. En effet, Ly49B agit peut être à un tout autre niveau sur l'activité cellulaire et n'a peut-être rien à voir avec la production du NO et la phagocytose. Il n'est présentement pas possible de déterminer si l'une ou l'autre de ces trois hypothèses peut expliquer l'échec des tentatives d'inhibition. Pour répondre à cette interrogation, il faudrait peut-être se tourner vers une fonction plus élémentaire telle que l'inhibition de la relâche du calcium intracellulaire. Cette fonction peut être inhibée via le récepteur PIR-B (Uehara *et al.*, 2001). En effet, le coengagement des récepteurs PIR-B et Fc $\epsilon$ RI par des anticorps les reconnaissant inhibe la mobilisation du calcium intracellulaire normalement initié par le récepteur Fc $\epsilon$ RI chez des mastocytes. La réussite d'une telle expérience avec le récepteur Ly49B nous confirmerait alors que l'anticorps 3LP218 peut agir comme agoniste du ligand naturel du récepteur. Une autre alternative serait d'utiliser les cellules JB et d'analyser la capacité du récepteur Ly49B à inhiber une activation induite par le TCR. De telles expériences ont déjà été réalisées dans notre laboratoire avec les récepteurs Ly49A et Ly49C (Roger *et al.*, 2001; Chalifour *et al.*, 2003). Les cellules étaient stimulées via le TCR par un anti-CD3 ou un superantigène. Le coengagement des récepteurs Ly49A et Ly49C a permis d'inhiber l'activation de NF-AT, la sécrétion d'IL-2 et l'apoptose induite par l'activation. Toutefois, si une inhibition était observée dans les mêmes conditions avec le récepteur Ly49B, il est peu probable que cela refléterait une situation retrouvée *in vivo* puisque ce récepteur n'est pas exprimé par une proportion importante de lymphocytes T.

Le rôle physiologique du récepteur Ly49B demeure donc inconnu. Il serait intéressant d'évaluer sa capacité à inhiber ou à promouvoir l'apoptose. Il ne faut pas oublier que les neutrophiles meurent spontanément par apoptose après quelques heures dans la circulation sanguine. Puisque ce type de cellules est un des principaux à exprimer Ly49B il serait donc raisonnable qu'il puisse contribuer à réguler leur survie ou leur mort. D'ailleurs il a récemment été démontré que chez l'humain, les récepteurs de mort de la famille TNF/NGF peuvent, en plus d'induire l'apoptose de la cellule, recruter des phosphatases, dont SHP-1, et ainsi inhiber les voies anti-apoptotiques initiées par des signaux de survie tels que les cytokines GM-CSF, G-CSF et l'IFN $\gamma$  (Daigle *et al.*, 2002). Il est donc fort possible qu'un tel phénomène soit aussi présent chez la souris. Puisque le récepteur Ly49B peut aussi recruter la protéine SHP-1, Ly49B pourrait peut-être intervenir dans les processus de régulation de l'apoptose. Encore une fois, d'autres expériences seront nécessaires pour répondre à ces nouvelles questions.

## VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La première partie des travaux présentés dans ce mémoire concernait l'expression des récepteurs Ly49 inhibiteurs par les cellules NK et les lymphocytes T. Notre premier objectif visait à comparer l'expression de récepteurs inhibiteurs sur les cellules NK et les différentes sous-populations de lymphocytes T NK1.1<sup>+</sup>. Le point à retenir des résultats est que chacune des populations cellulaires testées exprime les récepteurs Ly49 à des proportions différentes. De plus, un même récepteur Ly49 n'est pas exprimé uniformément parmi les populations testées. Avec le second objectif, nous voulions déterminer le rôle que jouent certaines cytokines dans la régulation de l'expression des récepteurs Ly49 inhibiteurs. Encore une fois, les résultats ont varié selon la population analysée, selon le récepteur Ly49 ainsi que selon la cytokine de l'étude. Les résultats suggèrent donc que l'expression des récepteurs Ly49 varie en fonction des stimuli perçus par les cellules, notamment ceux induits par les cytokines retrouvées dans leur microenvironnement. De plus, la modulation à la hausse ou à la baisse de l'expression d'un récepteur Ly49 pourrait avoir une conséquence directe sur la capacité de ce récepteur à inhiber l'activité de la cellule qui l'exprime.

Dans le second volet des travaux, nous avons amorcé la caractérisation du récepteur Ly49B grâce au nouvel anticorps monoclonal (3LP218) que nous avons produit. Nos résultats ont permis de mettre à jour plusieurs caractéristiques du récepteur Ly49B, confirmant ainsi sa singularité parmi la famille Ly49. L'expression de ce récepteur d'inhibition que nous avons observée sur des cellules de la lignée myéloïde indique que l'activation de plusieurs des cellules du système immunitaire est probablement régulée d'une façon similaire, malgré les rôles variables des différentes cellules.

Bien que nous ayons pu prouver le potentiel inhibiteur du récepteur Ly49B, nous n'avons pas été en mesure d'identifier à quel niveau il intervient dans les processus de régulation de l'activation des cellules. Pour la suite du projet, l'identification du ligand naturel du récepteur Ly49B pourrait nous faciliter la tâche pour déterminer sa fonction physiologique. Nous pourrions prendre avantage des cellules JB et JWT, la seule

différence entre ces deux lignées étant l'expression élevée du récepteur Ly49B. Par des tests d'adhésion avec d'autres types de cellules, nous pourrions ainsi détecter des cellules qui expriment un ligand de Ly49B lorsque celles-ci se lieraient aux cellules JB et non aux cellules JWT. Une autre alternative serait d'utiliser une méthode similaire à celle employée par Diefenbach et collaborateurs qui ont produit des tétramères du domaine extracellulaire du récepteur NKG2D pour marquer et identifier les différents types cellulaires exprimant le ligand de ce récepteur (Diefenbach *et al.*, 2000). Ils ont ensuite cloné les gènes codant pour les protéines marquées par les tétramères, ce qui leur a permis de les identifier. L'identité d'un ligand du récepteur Ly49 permettrait de déterminer ses fonctions plus facilement. Néanmoins, il serait tout de même intéressant d'évaluer si l'engagement du récepteur Ly49B par l'anticorps 3LP218 peut provoquer l'inhibition du relâchement intracellulaire du calcium. Le résultat de cette expérience confirmerait si l'anticorps peut agir comme agoniste du ligand naturel. Nous pourrions aussi évaluer la capacité de Ly49B à inhiber la sécrétion de cytokines par les cellules myéloïdes. De plus, il pourrait être nécessaire d'activer les cellules via d'autres récepteurs que ceux du LPS et de l'IFN $\gamma$  car l'activation cellulaire via ces récepteurs ne semble pas être la situation optimale pour observer une inhibition via le récepteur Ly49B. L'activation via les récepteurs de la famille TREM pourrait alors s'avérer intéressante, d'autant plus que certains membres de cette famille ont été détectés sur les cellules de macrophages RAW264.7 (Chung, Seaman et Daws, 2002). Une fois qu'une fonction aura été inhibée via le récepteur Ly49B, il sera intéressant d'évaluer si l'activation de cellules dont l'expression de ce récepteur aura été modulée à la hausse sera plus facilement inhibée via Ly49B. Cela pourra alors nous indiquer si les modulations d'expression de Ly49B par l'IFN $\gamma$ , le LPS et le poly I:C ont une signification physiologique.

Enfin, les travaux réalisés au cours de ce projet de maîtrise ont contribué à l'élargissement de nos connaissances sur la famille des récepteurs Ly49. Malgré la grande homologie qui existe entre les différents membres de cette famille, nos travaux combinés à ceux d'autres équipes mettent bien en évidence la diversité des propriétés des récepteurs Ly49. C'est un petit pas de plus dans notre compréhension du fonctionnement du système immunitaire...

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Allan D. S., A. J. McMichael et V. M. Braud. 2000. "The ILT family of leukocyte receptors". Immunobiology, vol. 202, p. 34-41.
- Anderson S. K., J. R. Ortaldo et D. W. McVicar. 2001. "The ever-expanding Ly49 gene family: repertoire and signaling". Immunol Rev, vol. 181, p. 79-89.
- Arase H., N. Arase et T. Saito. 1996. "Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking". J Exp Med, vol. 183, p. 2391-6.
- Arase H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill et L. L. Lanier. 2002. "Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors". Science, vol. 296, p. 1323-6.
- Assarsson E., T. Kambayashi, J. K. Sandberg, S. Hong, M. Taniguchi, L. Van Kaer, H. G. Ljunggren et B. J. Chambers. 2000. "CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo". J Immunol, vol. 165, p. 3673-9.
- Azzoni L., O. Zatsepina, B. Abebe, I. M. Bennett, P. Kanakaraj, B. Perussia. 1998. "Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells". J Immunol, vol. 161, p. 3493-500.
- Bendelac A., M. N. Rivera, S. H. Park et J. H. Roark. 1997. "Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function". Annu Rev Immunol, vol. 15, p. 535-62.
- Berland R. H. H. Wortis. 2002. "Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5". Annu Rev Immunol, vol. 20, p. 253-300.
- Bertone S., F. Schiavetti, R. Bellomo, C. Vitale, M. Ponte, L. Moretta et M. C. Mingari. 1999. "Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes". Eur J Immunol, vol. 29, p. 23-9.
- Biron C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens et T. P. Salazar-Mather. 1999. "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines". Annu Rev Immunol, vol. 17, p. 189-220.
- Biron C. A et L. Brossay. 2001. "NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections". Curr Opin Immunol, vol 13, p. 458-64.
- Bléry M., H. Kubagawa, C. C. Chen, F. Vély, M. D. Cooper et E. Vivier. 1998. "The paired Ig-like receptor PIR-B is an inhibitory receptor that recruits the protein-tyrosine phosphatase SHP-1". Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, p. 2446-51.

Brennan J., D. Mager, W. Jefferies, et F. Takei. 1994. "Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties". J Exp Med, vol. 180, p. 2287-95.

Brennan J., F. Takei, S. Wong et D. L. Mager. 1995. "Carbohydrate recognition by a natural killer cell receptor, Ly-49C". J Biol Chem, vol. 270, p. 9691-4.

Brennan J., G. Mahon, D. L. Mager, W. A. Jefferies et F. Takei. 1996a. "Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by Ly-49: specificities and domain interactions". J Exp Med, vol. 183, p. 1553-9.

Brennan J., Lemieux S., J. D. Freeman, D. L. Mager et F. Takei. 1996b. "Heterogeneity among Ly-49C natural killer (NK) cells: characterization of highly related receptors with differing functions and expression patterns". J Exp Med, vol. 184, p. 2085-90.

Brown M. G., S. Fulmek, K. Matsumoto, R. Cho, P. A. Lyons, E. R. Levy, A. A. Scalzo et W. M. Yokoyama. 1997. "A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6". Genomics, vol. 42, p. 16-25.

Brown M.G. , A. A. Scalzo, L. R. Stone, P. Y. Clark, Y. Du, B. Palanca et W. M. Yokoyama. 2001a. "Natural killer gene complex (Nkc) allelic variability in inbred mice: evidence for Nkc haplotypes". Immunogenetics, vol. 53, p. 584-91.

Brown M. G., A. O. Dokun, J. W. Heusel, H. R. Smith, D. L. Beckman, E. A. Blattenberger, C. E. Dubbelde, L. R. Stone, A. A. Scalzo et W. M. Yokoyama. 2001b. "Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection". Science, vol. 292, p. 934-7.

Brumbaugh K. M. , B. A. Binstadt et P.J. Leibson. 1998. "Signal transduction during NK cell activation: balancing opposing forces". Curr Top Microbiol Immunol, vol. 230, p. 103-22.

Carnaud C., D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka et A. Bendelac. 1999. "Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells". J Immunol, vol. 163, p. 4647-50.

Castells M. C., L. B. Klickstein, K. Hassani, J. A. Cumplido, M. E. Lacouture, K. F. Austen et H. R. Katz. 2001. "gp49B1-alpha(v)beta3 interaction inhibits antigen-induced mast cell activation". Nat Immunol, vol. 2, p. 436-42.

Chalifour A., J. Roger, S. Lemieux, P. Duplay. 2003. "Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with TCR-mediated activation." Immunology, vol. 109, p. 58-67.

Chakir H., A. A. Camilucci, L. G. Fillion et J.R. Webb. 2000. "Differentiation of murine NK cells into distinct subsets based on variable expression of the IL-12R beta 2 subunit". J Immunol, vol. 165, p. 4985-93.

Chan P. Y., et F. Takei. 1988. "Characterization of a murine T cell surface disulfide-linked dimer of 45-kDa glycopeptides (YE1/48 antigen). Comparison with T cell receptor, purification, and partial amino acid sequences". J Immunol, vol. 140, p.161-9.

Chen H. et W. E. Paul. 1997. "Cultured NK1.1+ CD4+ T cells produce large amounts of IL-4 and IFN-gamma upon activation by anti-CD3 or CD1". J Immunol, vol. 159, p. 2240-9.

Chen Y. H., N. M. Chiu, M. Mandal, N. Wang et C. R. Wang. 1997. "Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice". Immunity, vol. 6, p. 459-67.

Chung D. H., W. E. Seaman et M. R. Daws. 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, vol. 32, p. 59-66.

Clynes R. A., T. L. Towers, L. G. Presta et J. V. Ravetch. 2000. "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets". Nat Med, vol, 6, p. 443-6.

Coles M. C., C. W. McMahon, H. Takizawa et D. H. Raulet. 2000. "Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors". Eur J Immunol, vol. 30, p. 236-44.

Coles M. C et D. H. Raulet. 2000. "NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells". J Immunol, vol. 164, p. 2412-8.

Coligan J. E., A. M. Kruisheck, D. H. Margulies, E. M. Shevach et W. Strober. 2002. Current protocols in immunology. USA. John Wiley & sons, Inc., Chapitre 8.

Colonna M., H. Nakajima, F. Navarro et M. Lopez-Botet. 1999. "A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells". J Leukoc Biol, vol. 66, p. 375-81.

Colucci F., S. I. Samson, R. P. DeKoter, O. Lantz, H. Singh, J. P. Di Santo. 2001. "Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells". Blood, vol. 97, p. 2625-32.

Corral L., H. Takizawa, T. Hanke, A. M. Jamieson et D. H. Raulet. 1999. "A new monoclonal antibody reactive with several Ly49 NK cell receptors mediates redirected lysis of target cells". Hybridoma, vol. 18, p. 359-66.

Correa I., Corral L et D. H. Raulet. 1994. "Multiple natural killer cell-activating signals are inhibited by major histocompatibility complex class I expression in target cells". Eur J Immunol, vol. 24, p. 1323-31.

Cui J., T. Shin, T. Kawano, H. Sato, E. Kondo, I. Toura, Y. Kaneko, H. Koseki, M. Kanno et M. Taniguchi. 1997. "Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors". Science, vol. 278, p. 1623-6.

Daigle I., S. Yousefi, M. Colonna, D. R. Green et H. U. Simon. 2002. "Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils". Nat Med, vol. 8, p. 61-7.

Daniels B. F., M. C. Nakamura, S. D. Rosen, W. M. Yokoyama et W. E. Seaman. 1994. "Ly-49A, a receptor for H-2Dd, has a functional carbohydrate recognition domain". Immunity, vol. 1, p. 785-92.

Daniels K. A., G. Devora, W. C. Lai, C. L. O'Donnell, M. Bennett et R. M. Welsh. 2001. "Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H". J Exp Med, vol. 2, p. 29-44.

Depatie C., A. Chalifour, C. Pare, S. H. Lee, S. M. Vidal et S. Lemieux. 1999. "Assessment of Cmv1 candidates by genetic mapping and in vivo antibody depletion of NK cell subsets". Int Immunol, vol 11, p. 1541-51.

Derre L., M. Corvaisier, M. C. Pandolfino, E. Diez, F. Jotereau et N. Gervois. 2002. "Expression of CD94/NKG2-A on human T lymphocytes is induced by IL-12: implications for adoptive immunotherapy". J Immunol, vol. 168, p. 4864-70.

Diefenbach A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri, D. H. Raulet. 2000. "Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages". Nat Immunol, vol. 1, p. 119-26.

Dimasi N., M. W. Sawicki, L. A. Reineck, Y. Li, K. Natarajan, D. H. Margulies et R. A. Mariuzza. 2002. "Crystal structure of the Ly49I natural killer cell receptor reveals variability in dimerization mode within the Ly49 family". J Mol Biol, vol. 320, p. 573-85.

Dissen E., J. C. Ryan, W. E. Seaman et S. Fossom. 1996. "An autosomal dominant locus, Nka, mapping to the Ly-49 region of a rat natural killer (NK) gene complex, controls NK cell lysis of allogeneic lymphocytes". J Exp Med, vol.183, p. 2197-207.

Dokun A. O., S. Kim, H. R. Smith, H. S. Kang, D. T. Chu et W. M. Yokoyama. 2001. "Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection". Nat Immunol, vol. 2, p. 951-6.

Dong Q., K. A. Siminovitch, L. Fialkow, T. Fukushima et G. P. Downey. 1999. "Negative regulation of myeloid cell proliferation and function by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase-1". J Immunol, vol. 162, p. 3220-30.

Dorfman J. R. et D. H. Raulet. 1998. "Acquisition of Ly49 receptor expression by developing natural killer cells". J Exp Med, vol. 187, p. 609-18.

- Drickamer K et M. E. Taylor. 1993. "Biology of animal lectins". Annu Rev Cell Biol, vol. 9, p. 237-64.
- Eberl G. et H. R. MacDonald. 1998. "Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis". Immunity, vol. 9, p. 345-53.
- Eberl G., R. Lees, S. T. Smiley, M. Taniguchi, M. J. Grusby et H. R. MacDonald. 1999. "Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells". J Immunol, vol. 162, p. 6410-9.
- Eberl G., P. Brawand et H. R. MacDonald. 2000. "Selective bystander proliferation of memory CD4+ and CD8+ T cells upon NK T or T cell activation". J Immunol, vol. 165, p. 4305-11.
- Eberl G. et H. R. MacDonald. 2000. "Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells". Eur J Immunol, vol. 30, p. 985-92.
- Emoto M., J. Zerrahn, M. Miyamoto, B. Perarnau et S. H. Kaufmann. 2000. "Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells". Eur J Immunol, vol. 30, p. 2300-11.
- Fahlén L., U. Lendahl, C. L. Sentman. 2001. "MHC class I-Ly49 interactions shape the Ly49 repertoire on murine NK cells". J Immunol, vol. 166, p. 6585-92.
- Franksson L., J. Sundbäck, A. Achour, J. Bernlind, R. Glas et K. Kärre. 1999. "Peptide dependency and selectivity of the NK cell inhibitory receptor Ly-49C". Eur J Immunol, vol. 29, p. 2748-58.
- Funatogawa K., M. Matsuura, M. Nakano, M. Kiso et A. Hasegawa. 1998. "Relationship of structure and biological activity of monosaccharide lipid A analogues to induction of nitric oxide production by murine macrophage RAW264.7 cells". Infect Immun, vol. 66, p. 5792-8.
- Gapin L., J. L. Matsuda, C. D. Surh et M. Kronenberg. 2001. "NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d". Nat Immunol, vol. 2, p. 971-8.
- Gerber J. S. et D. M. Mosser. 2001. "Stimulatory and inhibitory signals originating from the macrophage Fcγ receptors". Microbes Infect, vol. 3, p. 131-9.
- Godfrey D. I., K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth, A. G. Baxter. 2000. "NKT cells: facts, functions and fallacies". Immunol Today, vol. 21, p. 573-83.
- Goding J. W. 1986. Monoclonal antibodies: principles and practice. 2<sup>e</sup> édition. San Diego: Academic Press, p. 241-280.

- Goldsby R. A., B. A. Osborne et T. J. Kindt. 2000. Kuby Immunology. 4<sup>e</sup> édition. New York : W. H. Freeman and company, chapitre 2, p. 27-60.
- Gosselin P., Y. Lusignan et S. Lemieux. 1993. "The murine NK2.1 antigen: a 130 kD glycoprotein dimer expressed by a natural killer cell subset of the spleen, thymus and lymph nodes". Mol Immunol, vol. 30, p. 1185-93.
- Gosselin P., Y. Lusignan, J. Brennan, F. Takei et S. Lemieux. 1997. "The NK2.1 receptor is encoded by Ly-49C and its expression is regulated by MHC class I alleles". Int Immunol, vol. 9, p. 533-40.
- Gosselin P., L. H. Mason, J. Willette-Brown, J. R. Ortaldo, D. W. McVicar et S. K. Anderson. 1999. "Induction of DAP12 phosphorylation, calcium mobilization, and cytokine secretion by Ly49H". J Leukoc Biol, vol. 66, p. 165-71.
- Gosselin P., A. P. Makrigiannis, R. Nalewaik et S. K Anderson. 2000. "Characterization of the Ly49I promoter". Immunogenetics, vol. 51, p. 326-31.
- Green S. J., M. S. Meltzer, J. B. Jr Hibbs, C. A. et Nacy. 1990. "Activated macrophages destroy intracellular Leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism". J Immunol, vol. 144, p. 278-83.
- Gumperz J. E M. B. Brenner. 2001. "CD1-specific T cells in microbial immunity". Curr Opin Immunol, vol. 13, p. 471-8.
- Hameg A., C. Gouarin, J. M. Gombert, S. Hong, L. Van Kaer, J. F. Bach et A. Herbelin. 1999. "IL-7 up-regulates IL-4 production by splenic NK1.1+ and NK1.1- MHC class I-like/CD1-dependent CD4+ T cells". J Immunol, vol. 162, p. 7067-74.
- Hammond K. J., L. D. Poulton, L. J. Palmisano, P. A. Silveira, D.I. Godfrey A. G. Baxter. 1998. "alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10". J Exp Med, vol. 187, p. 1047-56.
- Hanke T., H. Takizawa, C. W. McMahon, D. H. Busch, E. G. Pamer, J. D. Miller, J.D. Altman, Y. Liu, D. Cado, F. A. Lemonnier, P. J. Bjorkman et D. H. Raulet. 1999. "Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors". Immunity, vol. 11, p. 67-77.
- Hanke T. et D. H. Raulet. 2001. "Cumulative inhibition of NK cells and T cells resulting from engagement of multiple inhibitory Ly49 receptors". J Immunol, vol. 166, p. 3002-7.
- Held W. et D. H. Raulet. 1997. "Ly49A transgenic mice provide evidence for a major histocompatibility complex-dependent education process in natural killer cell development". J Exp Med, vol. 185, p. 2079-88.

Held W., B. Kunz, V. Ioannidis et B. Lowin-Kropf. 1999a. "Mono-allelic Ly49 NK cell receptor expression". Semin Immunol, vol. 11, p. 349-55.

Held W., B. Kunz, B. Lowin-Kropf, M. van de Wetering et H. Clevers. 1999b. "Clonal acquisition of the Ly49A NK cell receptor is dependent on the trans-acting factor TCF-1". Immunity, vol. 11, p. 433-42.

Hestdal K., F. W. Ruscetti, J. N. Ihle, S. E. Jacobsen, C. M. Dubois, W. C. Kopp, D. L. Longo et J. R. Keller. 1991. "Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells". J Immunol, vol. 147, p. 22-8.

Ho L. H., T. Uehara, C. C. Chen, H. Kubagawa et M. D. Cooper. 1999. "Constitutive tyrosine phosphorylation of the inhibitory paired Ig-like receptor PIR-B". Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 96, p. 15086-90.

Hunter S., Z. K. Indik, M. K. Kim, M. D. Cauley, J. G. Park et A. D. Schreiber. 1998. "Inhibition of Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fc $\gamma$  Receptor". Blood, vol. 91, p. 1762-8.

Jamieson A. M., A. Diefenbach, C. W. McMahon, N. Xiong, J. R. Carlyle et D. H. Raulet. 2002. "The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing". Immunity, vol. 17, p. 19-29.

Judge A. D., X. Zhang, H. Fujii, C. D. Surh et J. Sprent. 2002. "Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells". J Exp Med, vol. 196, p. 935-46.

Kambayashi T., E. Assarsson, J. Michaelsson, P. Berglund, A. D. Diehl, B. J. Chambers et H. G. Ljunggren. 2000. "Emergence of CD8+ T cells expressing NK cell receptors in influenza A virus-infected mice". J Immunol, vol. 165, p. 4964-9.

Kambayashi T., E. Assarsson, B. J. Chambers, H. G. Ljunggren. 2001. "Expression of the DX5 antigen on CD8+ T cells is associated with activation and subsequent cell death or memory during influenza virus infection". Eur J Immunol, vol. 31, p. 1523-30.

Kane K.P. 1994. "Ly-49 mediates EL4 lymphoma adhesion to isolated class I major histocompatibility complex molecules". J Exp Med, vol. 179, p. 1011-5.

Kane K. P., E. T. Silver et B. Hazes. 2001. "Specificity and function of activating Ly-49 receptors". Immunol Rev, vol. 181, p.104-14.

Kant A. M., P. De, X. Peng, T. Yi, D. J. Rawlings, J. S. Kim et D. L. Durden. 2002. "SHP-1 regulates Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and the activation of RAC". Blood, vol. 100, p. 1852-9.

Karlhofer F. M., R. K. Ribaldo et W. M. Yokoyama. 1992. "MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells". Nature, vol. 358, p. 66-70.

- Karlhofer F. M., R. Hunziker, A. Reichlin, D. H. Margulies et W. M. Yokoyama. 1994. "Host MHC class I molecules modulate in vivo expression of a NK cell receptor". J Immunol, vol. 153, p. 2407-16.
- Kåse A., M. H. Johansson, M. Y. Olsson-Alheim, K. Kärre et P. Höglund. 1998. "External and internal calibration of the MHC class I-specific receptor Ly49A on murine natural killer cells". J Immunol, vol. 161, p. 6133-8.
- Katz H. R. 2002. "Inhibitory receptors and allergy". Curr Opin Immunol, vol. 14, p. 698-704.
- Kawano T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, H. Sato, E. Kondo, M. Harada, H. Koseki, T. Nakayama, Y. Tanaka et M. Taniguchi. 1998. "Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells". Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, p. 5690-3.
- Kiessling R., E. Klein et H. Wigzell. 1975 "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype". Eur J Immunol, vol. 5, p. 112-7.
- Kitamura H., A. Ohta, M. Sekimoto, M. Sato, K. Iwakabe, M. Nakui, T. Yahata, H. Meng, T. Koda, S. Nishimura, T. Kawano, M. Taniguchi et T. Nishimura. 2000. "alpha-galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells". Cell Immunol, vol. 10, p. 37-42.
- Korten S., L. Volkmann, M. Saefel, K. Fischer, M. Taniguchi, B. Fleischer et A. Hoerauf. 2002. "Expansion of NK cells with reduction of their inhibitory Ly-49A, Ly-49C, and Ly-49G2 receptor-expressing subsets in a murine helminth infection: contribution to parasite control". J Immunol, vol. 168, p. 5199-206.
- Kronenberg M et L. Gapin. 2002. "The unconventional lifestyle of NKT cells". Nat Rev Immunol, vol. 2, p. 557-68.
- Kubagawa H., P. D. Burrows et M. D. Cooper. 1997. "A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells". Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 94, p. 5261-6.
- Kubagawa H., C. C. Chen, L. H. Ho, T. S. Shimada, L. Gartland, C. Mashburn, T. Uehara, J. V. Ravetch et M. D. Cooper. 1999. "Biochemical nature and cellular distribution of the paired immunoglobulin-like receptors, PIR-A and PIR-B". J Exp Med, vol. 189, p. 309-18.
- Kubota A., S. Kubota, S. Lohwasser, D.L. Mager et F. Takei. 1999a. "Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice". J Immunol, vol. 163, p. 212-6.

Kubota A., R. H. Lian, S. Lohwasser, M. Salcedo et F. Takei. 1999b. "IFN-gamma production and cytotoxicity of IL-2-activated murine NK cells are differentially regulated by MHC class I molecules". J Immunol, vol. 163, p. 6488-93.

Kunz B. et W. Held. 2001. "Positive and negative roles of the trans-acting T cell factor-1 for the acquisition of distinct Ly-49 MHC class I receptors by NK cells". J Immunol, vol. 15, p. 6181-7.

LaBelle J. L. et R. L. Truitt. 2002. "Characterization of a murine NKT cell tumor previously described as an acute myelogenous leukemia". Leuk Lymphoma, vol. 43, p. 1637-44.

Lanier L. L. 1998. "NK cell receptors". Annu Rev Immunol, vol. 16, p. 359-93.

Lantz O., L. I. Sharara, F. Tilloy, A. Andersson et J. P. DiSanto. 1997. "Lineage relationships and differentiation of natural killer (NK) T cells: intrathymic selection and interleukin (IL)-4 production in the absence of NKR-P1 and Ly49 molecules". J Exp Med, vol. 185, p. 1395-401.

Lee S.H., S. Girard, D. Macina, M. Busa, A. Zafer, A. Belouchi, P. Gros et S. M. Vidal. 2001a. "Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily". Nat Genet, vol. 28, p. 42-5.

Lee S. H., J. Gitas, A. Zafer, P. Lepage, T. J. Hudson, A. Belouchi et S. M. Vidal. 2001b. "Haplotype mapping indicates two independent origins for the Cmv1s susceptibility allele to cytomegalovirus infection and refines its localization within the Ly49 cluster". Immunogenetics, vol. 53, p. 501-5.

Leite-de-Moraes M. C., A. Herbelin, J. M. Gombert, A. Vicari, M. Papiernik, et M. Dy. 1997. "Requirement of IL-7 for IL-4-producing potential of MHC class I-selected CD4-CD8-TCR alpha beta+ thymocytes". Int Immunol, vol. 9, p. 73-9.

Leite-De-Moraes M. C., G. Moreau, A. Arnould, F. Machavoine, C. Garcia, M. Papiernik et M. Dy. 1998. "IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells". Eur J Immunol, vol. 28, p. 1507-15.

Leite-De-Moraes M. C., A. Hameg, A. Arnould, F. Machavoine, Y. Koezuka, E. Schneider, A. Herbelin et M. Dy. 1999. "A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement". J Immunol, vol. 163, p. 5871-6.

Leite-De-Moraes M. C., A. Hameg, M. Pacilio, Y. Koezuka, M. Taniguchi, L. Van Kaer, E. Schneider, M. Dy et A. Herbelin. 2001. "IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells". J Immunol, vol. 166, p. 945-51.

Leite-de-Moraes M. C., M. Lisbonne, A. Arnould, F. Machavoine, A. Herbelin, M. Dy et E. Schneider. 2002. "Ligand-activated natural killer T lymphocytes promptly produce IL-3 and GM-CSF in vivo: relevance to peripheral myeloid recruitment". Eur J Immunol, vol. 32, p. 1897-904.

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

Lévesque A., 2001. Stratégie de production d'anticorps monoclonaux spécifiques de Ly49B, un récepteur particulier des cellules NK murines. Mémoire de Msc, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, 129 p.

Lian R. H., Y. Li, S. Kubota, D. L. Mager et F. Takei. 1999. "Recognition of class I MHC by NK receptor Ly-49C: identification of critical residues". J Immunol, vol. 162, p. 7271-6.

Liang S., B. Baibakov et A. Horuzsko. 2002. "HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory Receptor". Eur J Immunol, vol. 32, p. 2418-26.

Ljunggren H. G. et K. Kärre. 1990. "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition". Immunol Today, vol. 11, p. 237-44.

Lodolce J., P. Burkett, R. Koka, D. Boone, M. Chien, F. Chan, M. Madonia, S. Chai, A. Ma. 2002. "Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis". Mol Immunol, vol. 39, p. 537-44.

MacDonald H. R. 2002. "Development and selection of NKT cells". Curr Opin Immunol, vol. 14, p. 250-4.

Maeda M., S. Lohwasser, T. Yamamura et F. Takei. 2001. "Regulation of NKT cells by Ly49: analysis of primary NKT cells and generation of NKT cell line". J Immunol, vol. 167, p. 4180-6.

Mager D. L., K. L. McQueen, V. Wee et J. D. Freeman. 2001. "Evolution of natural killer cell receptors: coexistence of functional Ly49 and KIR genes in baboons". Curr Biol, vol. 11, p. 626-30.

Makrigiannis A. P. et S. K. Anderson. 2000. "Ly49 gene expression in different inbred mouse strains". Immunol Res, vol. 21, p. 39-47.

Makrigiannis A. P. et S. K. Anderson. 2001a. "Mechanisms controlling the expression and diversity of the Ly49 gene family". Mod Asp Immunobiol, vol. 1, p. 228-232.

- Makrigiannis A. P., A. T. Pau, A. Saleh, R. Winkler-Pickett, J. R. Ortaldo et S. K. Anderson. 2001b. "Class I MHC-binding characteristics of the 129/J Ly49 repertoire". J Immunol, vol. 166, p. 5034-43.
- Makrigiannis A. P., A. T. Pau, P. L. Schwartzberg, D. W. McVicar, T. W. Beck et S. K. Anderson. 2002. "A BAC contig map of the Ly49 gene cluster in 129 mice reveals extensive differences in gene content relative to C57BL/6 mice". Genomics, vol. 79, p. 437-44.
- Mason L. H., J. Willette-Brown, S. K. Anderson, P. Gosselin, E. W. Shores, P. E. Love, J. R. Ortaldo et D. W. McVicar. 1998. "Characterization of an associated 16-kDa tyrosine phosphoprotein required for Ly-49D signal transduction". J Immunol, vol. 160, p. 4148-52.
- Matsumoto N., M. Mitsuki, K. Tajima, W.M. Yokoyama et K. Yamamoto. 2001. "The functional binding site for the C-type lectin-like natural killer cell receptor Ly49A spans three domains of its major histocompatibility complex class I ligand". J Exp Med, vol. 193, p. 147-58.
- McMahon C. W., A. J. Zajac, A. M. Jamieson, L. Corral, G. E. Hammer, R. Ahmed et D. H. Raulet. 2002. "Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells". J Immunol, vol. 169, p. 1444-52.
- McQueen K. L., S. Lohwasser, F. Takei et D. L. Mager. 1999. "Expression analysis of new Ly49 genes: most transcripts of Ly49j lack the transmembrane domain". Immunogenetics, vol. 49, p. 685-91.
- McQueen K. L., B. T. Wilhelm, K. D. Harden et D. L. Mager. 2002. "Evolution of NK receptors: a single Ly49 and multiple KIR genes in the cow". Eur J Immunol, vol. 32, p. 810-7.
- Mehta I. K., J. Wang, J. Roland, D. H. Margulies et W. M. Yokoyama. 2001. "Ly49A allelic variation and MHC class I specificity". Immunogenetics, vol. 53, p. 572-83.
- Michaëlsson J., A. Achour, M. Salcedo, A. Kase-Sjostrom, J. Sundbäck, R. A. Harris et K. Kärre. 2000. "Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity with soluble major histocompatibility complex class I tetramers". Eur J Immunol, vol. 30, p. 300-7.
- Mingari M. C., M. Ponte, S. Bertone, F. Schiavetti, C. Vitale, R. Bellomo, A. Moretta et L. Moretta. 1998. "HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells". Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, p. 1172-7.
- Morelli L. et Lemieux S. 1993. "Triggering of the cytotoxic activity of murine natural killer and lymphokine-activated killer cells through the NK2.1 antigen". J Immunol, vol. 151, p. 6783-93.

- Morris M. A., E. Koulich, J. Liu, V. Arora, T. C. George, J. D. Schatzle, V. Kumar, et M. Bennett. 2002a. "Definition of additional functional ligands for Ly49I(B6) using FVBLy49I(B6) transgenic mice and B6 natural killer cell effectors". Transplantation, vol. 74, p. 1449-54.
- Morris M. A., J. Liu, V. Arora, T. C. George, J. Klem, J. D. Schatzle, V. Kumar, M. Bennett. 2002b. "B6 strain Ly49I inhibitory gene expression on T cells in FVB.Ly49IB6 transgenic mice fails to prevent normal T cell functions". J Immunol, vol. 169, p. 3661-6.
- Nagasawa R., J. Gross, O. Kanagawa, K. Townsend, L. L. Lanier, J. Chiller et J. P. Allison. 1987. "Identification of a novel T cell surface disulfide-bonded dimer distinct from the alpha/beta antigen receptor". J Immunol, vol. 138, p. 815-24.
- Nakamura M. C., E. C. Niemi, M. J. Fisher, L. D. Shultz, W. E. Seaman et J. C. Ryan. 1997. "Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in natural killer cell cytotoxicity and functionally associates with the SHP-1 tyrosine phosphatase". J Exp Med, vol. 185, p. 673-84.
- Natarajan K., L. F. Boyd, P. Schuck, W. M. Yokoyama, D. Eliat et D. H. Margulies. 1999. "Interaction of the NK cell inhibitory receptor Ly49A with H-2Dd: identification of a site distinct from the TCR site". Immunity, vol. 11, p. 591-601.
- Natarajan K., N. Dimasi, J. Wang, R. A. Mariuzza et D. H. Margulies. 2002. "Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination". Annu Rev Immunol, vol. 20, p. 853-85.
- Oberg L., M. Eriksson, L. Fahlen et C. L. Sentman. 2000. "Expression of Ly49A on T cells alters the threshold for T cell responses". Eur J Immunol, vol. 30, p. 2849-56.
- Ochi H. et T. Watanabe. 2000. "Negative regulation of B cell receptor-mediated signaling in B-1 cells through CD5 and Ly49 co-receptors via Lyn kinase activity". Int Immunol, vol. 12, p. 1417-23.
- Oda T. et H. Maeda. 1986. "A new simple fluorometric assay for phagocytosis". J Immunol Methods, vol. 88, p. 175-83.
- Olsson M.Y., K. Kärre et C. L. Sentman. 1995. "Altered phenotype and function of natural killer cells expressing the major histocompatibility complex receptor Ly-49 in mice transgenic for its ligand". Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 92, p. 1649-53.
- Olsson-Alheim M. Y., M. Salcedo, H. G. Ljunggren, K. Karre et C. L. Sentman. 1997. "NK cell receptor calibration: effects of MHC class I induction on killing by Ly49A<sup>high</sup> and Ly49A<sup>low</sup> NK cells". J Immunol, vol. 159, p. 3189-94.
- Olsson-Alheim M. Y., J. Sundbäck, K. Kärre et C. L. Sentman. 1999. "The MHC class I molecule H-2Dp inhibits murine NK cells via the inhibitory receptor Ly49A". J Immunol, vol. 162, p. 7010-4.

- Orihuela M., D. H. Margulies et Y. M. Yokoyama. 1996. "The natural killer cell receptor Ly-49A recognizes a peptide-induced conformational determinant on its major histocompatibility complex class I ligand". Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93, p. 11792-7.
- Ortaldo J. R., L. H. Mason, T. A. Gregorio, J. Stoll et R. T. Winkler-Pickett. 1997. "The Ly-49 family: regulation of cytokine production in murine NK cells". J Leukoc Biol, vol. 62, p. 381-8.
- Ortaldo J. R., R. Winkler-Pickett et G. Wiegand. 2000. "Activating Ly-49D NK receptors: expression and function in relation to ontogeny and Ly-49 inhibitor receptors". J Leukoc Biol, vol. 68, p. 748-56.
- Ortaldo J. R., E. W. Bere, D. Hodge et H. A. Young. 2001. "Activating Ly-49 NK receptors: central role in cytokine and chemokine production". J Immunol, vol. 166, p. 4994-9.
- O'Shea J. J., D. W. McVicar, T. L. Bailey, C. Burns et M. J. Smyth. 1992. "Activation of human peripheral blood T lymphocytes by pharmacological induction of protein-tyrosine phosphorylation". Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 89, p. 10306-10.
- Osman Y., T. Kawamura, T. Naito, K. Takeda, L. Van Kaer, K. Okumura T. Abo. 2000. "Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide". Eur J Immunol, vol. 30, p. 1919-28.
- Ohteki T. 2002. "Critical role for IL-15 in innate immunity". Curr Mol Med, vol. 2, p. 371-80.
- Paré C., 2001. Étude de la distribution et des propriétés fonctionnelles d'un antigène spécifique des cellules NK murines à l'aide de nouveaux anticorps monoclonaux xénogéniques. Mémoire de Msc, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval, 158 p.
- Peacock C. D., M. Y. Lin, J. R. Ortaldo et R. M. Welsh. 2000. "The virus-specific and allospecific cytotoxic T-lymphocyte response to lymphocytic choriomeningitis virus is modified in a subpopulation of CD8(+) T cells coexpressing the inhibitory major histocompatibility complex class I receptor Ly49G2". J Virol, vol. 74, p. 7032-8.
- Plougastel B., K. Matsumoto, C. Dubbelde et W. M. Yokoyama. 2001 "Analysis of a 1-Mb BAC contig overlapping the mouse Nkrp1 cluster of genes: cloning of three new Nkrp1 members, Nkrp1d, Nkrp1e, and Nkrp1f". Immunogenetics, vol. 53, p. 592-8.
- Poggi A., Costa P., Tomasello E et L. Moretta. 1998. "IL-12-induced up-regulation of NKR1A expression in human NK cells and consequent NKR1A-mediated down-regulation of NK cell activation". Eur J Immunol, vol. 28, p. 1611-6.

Poulton L. D., M. J. Smyth, C. G. Hawke, P. Silveira, D. Shepherd, O. V. Naidenko, D. I. Godfrey et A. G. Baxter. 2001. "Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice". Int Immunol, vol. 13, p. 887-96.

Puzanov I. J., M. Bennett et V. Kumar. 1996. "IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells". J Immunol, vol. 157, p. 4282-5.

Ralph P. et I. Nakoinz. 1975. "Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line". Nature, vol. 257, p. 393-4.

Ralph P. et I. Nakoinz. 1977. "Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS". J Immunol, vol. 119, p. 950-54.

Raulet D.H., W. Held, I. Correa, J. R. Dorfman, M. F. Wu et L. Corral. 1997. "Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors". Immunol Rev, vol. 155, p. 41-52.

Raulet D.H., R.E. Vance et C.W. McMahon. 2001. "Regulation of the natural killer cell receptor repertoire". Annu Rev Immunol, vol. 19, p. 291-330.

Ravetch J. V. et J. P. Kinet. 1991. "Fc receptors". Annu Rev Immunol, vol. 9, p. 457-92.

Ravetch J. V. et L. L. Lanier. 2000. "Immune inhibitory receptors". Science, vol. 290, p. 84-9.

Reichlin A. et W. M. Yokoyama. 1998. "Natural killer cell proliferation induced by anti-NK1.1 and IL-2". Immunol Cell Biol, vol. 76, p. 143-52.

Roger J., A. Chalifour, S. Lemieux et P. Duplay. 2001. "Cutting edge: Ly49A inhibits TCR/CD3-induced apoptosis and IL-2 secretion". J Immunol, vol. 167, p. 6-10.

Rojo S., D. N. Burshtyn, E. O. Long et N. Wagtmann. 1997. "Type I transmembrane receptor with inhibitory function in mouse mast cells and NK cells". J Immunol, vol. 158, p. 9-12.

Roth C., J.R. Carlyle, H. Takizawa et D.H. Raulet. 2000. "Clonal acquisition of inhibitory Ly49 receptors on developing NK cells is successively restricted and regulated by stromal class I MHC". Immunity, vol. 13, p. 143-53.

Saleh A., A. P. Makrigiannis, D. L. Hodge et S.K. Anderson. 2002. "Identification of a novel Ly49 promoter that is active in bone marrow and fetal thymus". J Immunol, vol. 15, p. 5163-9.

Salcedo M., A. D. Diehl, M. Y. Olsson-Alheim, J. Sundbäck, L. Van Kaer, K. Kärre et H. G. Ljunggren. 1997. "Altered expression of Ly49 inhibitory receptors on natural killer cells from MHC class I-deficient mice". J Immunol, vol. 158, p. 3174-80.

Salcedo M., M. Andersson, S. Lemieux, L. Van Kaer, B. J. Chambers et H. G. Ljunggren. 1998. "Fine tuning of natural killer cell specificity and maintenance of self tolerance in MHC class I-deficient mice". Eur J Immunol, vol. 28, p. 1315-21.

Seaman W. E. 2000. "Natural killer cells and natural killer T cells". Arthritis Rheum, vol. 43, p. 1204-17.

Sentman C. L., M. Y. Olsson et K. Kärre. 1994. "Missing self recognition by natural killer cells in MHC class I transgenic mice. A 'receptor calibration' model for how effector cells adapt to self". Semin Immunol, vol. 7, p. 109-19.

Shapiro H. M. 1988. Practical flow cytometry. 2<sup>e</sup> édition. New York: Alan R. Liss Inc., Chapitre 7.

Sharif S., G. A. Arreaza, P. Zucker, Q. S. Mi, J. Sondhi, O. V. Naidenko, M. Kronenberg, Y. Koezuka, T. L. Delovitch, J. M. Gombert, M. Leite-De-Moraes, C. Gouarin, R. Zhu, A. Hameg, T. Nakayama, M. Taniguchi, F. Lepault, A. Lehuen, J. F. Bach, A. Herbelin. 2001. "Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes". Nat Med, vol. 7, p. 1057-62.

Sharif S., G. A. Arreaza, P. Zucker, Q. S. Mi, T. L. Delovitch. 2002. "Regulation of autoimmune disease by natural killer T cells". J Mol Med, vol. 80, p. 290-300.

Silver E. T., D. E. Gong, C. S. Chang, A. Amrani, P. Santamaria et K. P. Kane. 2000. "Ly-49P activates NK-mediated lysis by recognizing H-2Dd". J Immunol, vol. 165, p. 1771-81.

Silver E. T., D. Gong, B. Hazes et K. P. Kane. 2001. "Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H-2D(k) and H-2D(d)". J Immunol, vol. 166, p. 2333-41.

Sivakumar P. V., I. Puzanov, N. S. Williams, M. Bennett et V. Kumar. 1998. "Ontogeny and differentiation of murine natural killer cells and their receptors". Curr Top Microbiol Immunol, vol. 230, p. 161-90.

Sköld M et S. Cardell. 2000. "Differential regulation of Ly49 expression on CD4+ and CD4-CD8- (double negative) NK1.1+ T cells". Eur J Immunol, vol. 30, p. 2488-96.

Smith H. R., F. M. Karlhofer et W. M. Yokoyama. 1994. "Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated NK cells". J Immunol, vol. 153, p. 1068-79.

Smith H. R., H. H. Chuang, L. L. Wang, M. Salcedo, J.W. Heusel et W. M. Yokoyama. 2000. "Nonstochastic coexpression of activation receptors on murine natural killer cells". J Exp Med, vol. 191, p. 1341-54.

Smith K. M., J. Wu, A. B. Bakker, J. H. Phillips et L. L. Lanier. 1998. "Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors". J Immunol, vol. 161 p. 7-10.

Smyth M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, E. Cretney, J. A. Trapani, M. Taniguchi, T. Kawano, S. B. Pelikan, N. Y. Crowe et D. I. Godfrey. 2000. "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells". J Exp Med, vol. 191, p. 661-8.

Smyth M. J., N. Y. Crowe, Y. Hayakawa, K. Takeda, H. Yagita et D.I. Godfrey. 2002. "NKT cells - conductors of tumor immunity"? Curr Opin Immunol, vol. 14, p. 165-71.

Stewart C. C., Lehnert B. E. et J. A. Steinkamp. 1986. "In vitro and in vivo measurement of phagocytosis by flow cytometry". Methods Enzymol, vol. 132, p. 183-92.

Su I. et A. Tarakhovsky. 2000. "B-1 cells: orthodox or conformist?" Curr Opin Immunol, vol. 12, p. 191-4.

Sundbäck J., A. Achour, J. Michaëlsson, H. Lindström et K. Kärre. 2002. "NK cell inhibitory receptor Ly-49C residues involved in MHC class I binding". J Immunol, vol. 168, p. 793-800.

Takai T. et M. Ono. 2001. "Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family". Immunol Rev, vol. 181, p. 215-22.

Takeda K., S. Seki, K. Ogasawara, R. Anzai, W. Hashimoto, K. Sugiura, M. Takahashi, M. Satoh et K. Kumagai. 1996. "Liver NK1.1+ CD4+ alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis". J Immunol, vol. 156, p. 3366-73.

Takeda K., Y. Hayakawa, L. Van Kaer, H. Matsuda, H. Yagita, K. Okumura. 2000. "Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis". Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, p. 5498-503.

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

Takei F., K. L. McQueen, M. Maeda, B. T. Wilhelm, S. Lohwasser, R. H. Lian et D. L. Mager. 2001. "Ly49 and CD94/NKG2: developmentally regulated expression and evolution". Immunol Rev, vol. 181, p. 90-103.

Tay C. H., L. Y. Yu, V. Kumar, L. Mason, J. R. Ortaldo et R. M. Welsh. 1999. "The role of LY49 NK cell subsets in the regulation of murine cytomegalovirus infections". J Immunol, vol. 15, p. 718-26.

Terabe M., S. Matsui, N. Noben-Trauth, H. Chen, C. Watson, D. D. Donaldson, D. P. Carbone, W. E. Paul et J. A. Berzofsky. 2001. "NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway". Nat Immunol, vol. 1, p. 515-20.

Toomey J. A., S. Shrestha, S. A. de la Rue, F. Gays, J. H. Robinson, Z. M. Chrzanowska-Lightowlers et C. G. Brooks. 1998. "MHC class I expression protects target cells from lysis by Ly49-deficient fetal NK cells". Eur J Immunol, vol. 28, p. 47-56.

Tomura M., W. G. Yu, H. J. Ahn, M. Yamashita, Y. F. Yang, S. Ono, T. Hamaoka, T. Kawano, M. Taniguchi, Y. Koezuka, H. Fujiwara. 1999. "A novel function of Valpha14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system". J Immunol, vol. 163, p. 93-101.

Tormo J., K. Natarajan, D. H. Margulies et R. A. Mariuzza. 1999. "Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand". Nature, vol. 402, p. 623-31.

Toura I., T. Kawano, Y. Akutsu, T. Nakayama, T. Ochiai et M. Taniguchi. 1999. "Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide". J Immunol, vol. 163, p. 2387-91.

Trinchieri G. 2003. "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity". Nat Rev Immunol, vol. 3, p. 133-46.

Uehara T., M. Bléry, D. W. Kang, C. C. Chen, L. H. Ho, G. L. Gartland, F. T. Liu, E. Vivier, M. D. Cooper et H. Kubagawa. 2001. "Inhibition of IgE-mediated mast cell activation by the paired Ig-like receptor PIR-B". J Clin Invest, vol. 108, p. 1041-50.

Ugolini S. et E. Vivier. 2000. "Regulation of T cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules". Curr Opin Immunol, vol. 12, p. 295-300.

Vély F. et E. Vivier. 1996. "Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK". Médecines/Sciences, vol. 12, p. 458-64.

Vély F. et E. Vivier. 1997. "Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts". J Immunol, vol. 159, p. 2075-7.

Van Beneden K., F. Stevenaert, A. De Creus, V. Debacker, J. De Boever, J. Plum et G. Leclercq. 2001. "Expression of Ly49E and CD94/NKG2 on fetal and adult NK cells". J Immunol, vol. 166, p. 4302-11.

Wang L. L., I. K. Mehta, P. A. LeBlanc et W. M. Yokoyama. 1997. "Mouse natural killer cells express gp49B1, a structural homologue of human killer inhibitory receptors".

- Wang L. L., J. Blasioli, D. R. Plas, M. L. Thomas et W. M. Yokoyama. 1999. "Specificity of the SH2 domains of SHP-1 in the interaction with the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing receptor gp49B". J Immunol, vol. 162, p. 1318-23.
- Wang L. L., D. T. Chu, A. O. Dokun et W. M. Yokoyama. 2000. "Inducible expression of the gp49B inhibitory receptor on NK cells". J Immunol, vol. 164, p. 5215-20. J Immunol, vol. 158, p. 13-7.
- Wang B., Y. B. Geng et C. R. Wang. 2001. "CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes". J Exp Med, vol. 194, p. 313-20.
- Wang J., M. C. Whitman, K. Natarajan, J. Tormo, R. A. Mariuzza et D. H. Margulies. 2002. "Binding of the natural killer cell inhibitory receptor Ly49A to its major histocompatibility complex class I ligand. Crucial contacts include both H-2Dd AND beta 2-microglobulin". J Biol Chem, vol. 277, p. 1433-42.
- Weis W. I., M. E. Taylor et K. Drickamer. 1998. "The C-type lectin superfamily in the immune system". Immunol Rev, vol. 163, p. 19-34
- Westgaard I. H., S. F. Berg, S. Orstavik, S. Fossum et E. Dissen. 1998. "Identification of a human member of the Ly-49 multigene family". Eur J Immunol, vol. 6, p. 1839-46.
- Wilhelm B. T., K. L. McQueen, J. D. Freeman, F. Takei et D. L. Mager. 2001. "Comparative analysis of the promoter regions and transcriptional start sites of mouse Ly49 genes". Immunogenetics vol. 53, p. 215-24.
- Williams N. S., J. Klem, I.J. Puzanov, P.V. Sivakumar, M. Bennett et V. Kumar. 1999. "Differentiation of NK1.1+, Ly49+ NK cells from flt3+ multipotent marrow progenitor cells". J Immunol, vol. 163, p. 2648-56.
- Williams N. S., A. Kubota, M. Bennett, V. Kumar et F. Takei. 2000. "Clonal analysis of NK cell development from bone marrow progenitors in vitro: orderly acquisition of receptor gene expression". Eur J Immunol, vol. 30, p. 2074-82.
- Wilson S. B. et M.C. Byrne. 2001. "Gene expression in NKT cells: defining a functionally distinct CD1d-restricted T cell subset". Curr Opin Immunol, vol. 13, p. 555-61.
- Wong S., J. D. Freeman, C. Kelleher, D. Mager et F. Takei. 1991. "Ly-49 multigene family. New members of a superfamily of type II membrane proteins with lectin-like domains". J Immunol, vol. 15, p. 1417-23.
- Yokoyama W. M., L. B. Jacobs, O. Kanagawa, E. M. Shevach et D. I. Cohen. 1989. "A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins". J Immunol, vol. 143, p. 1379-86.

Zajac A. J., R. E. Vance, W. Held, D. J. Sourdive, J. D. Altman, D. H. Raulet et R Ahmed. 1999. "Impaired anti-viral T cell responses due to expression of the Ly49A inhibitory receptor". J Immunol, vol. 163, p. 5526-34.