Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Stratégies d'immunisations pour la production d'anticorps monoclonaux contre des récepteurs de cellules NK murines

Par
KARINE BLOUIN

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

Jury

Dr François Denis	président, INRS-IAF
Dr Lucie Lamontagne	examinateur externe, UQAM
Dr Suzanne Lemieux	directrice de recherche, INRS-IAF

avril 2002

© droits réservés de Karine Blouin, 2002

SOMMAIRE

Les cellules NK expriment de nombreux récepteurs en surface cellulaire. La famille de récepteurs NK murins concernée par le projet est appelée Ly49. Cette famille de récepteurs est apparentée aux lectines de type-C. Nous nous sommes intéressées plus précisément aux récepteurs Ly49E, F, H. Le répertoire des cellules NK est très complexe. Une seule cellule NK peut co-exprimer plusieurs récepteurs à sa surface, ce qui rend difficile l'étude du rôle d'un récepteur particulier. Les récepteurs Ly49 présentent une forte homologie de séquences en acides aminés dans leur portion extracellulaire. Sur cette base, des groupes d'homologie ont été définis au sein de la famille Ly49. Un de ces groupes comprend les récepteurs d'intérêts Ly49E, F et H qui sont très semblables entre eux. De plus, les populations qui expriment ces trois récepteurs sont de faible taille. Ce sont là autant d'obstacles limitant la production d'anticorps monoclonaux qui reconnaissent sélectivement chacun de ces récepteurs.

L'objectif du projet de maîtrise était de produire des anticorps monoclonaux réagissant uniquement avec les récepteurs Ly49E, F et H. Afin de valider la méthodologie employée, nous avons cru bon ajouter à l'étude un récepteur fortement exprimé à la surface des cellules NK, c'est-à-dire l'hétérodimère CD94/NKG2A. La stratégie que nous avons développée était d'utiliser comme outils des phages recombinants permettant d'aller chercher des hybridomes producteurs d'anticorps d'une spécificité prédéterminée. Des séquences cibles ont été identifiées dans le domaine extracellulaire des récepteurs visés puis des oligonucléotides ont été synthétisés et insérés dans le phage fUSE5. De bons rendements ont été obtenus. Une fois la banque de phages établie, le système de criblage ELISA a été mis au point. Les paramètres optimaux ont été déterminés. Les phages ont ensuite été utilisés pour le criblage des surnageants d'hybridomes. Pour la production d'anticorps, plusieurs protocoles d'immunisations ont été employés. D'abord, des cellules LAK ont été injectées à plusieurs reprises à des rats de différentes souches. Suite aux fusions, autant le pourcentage de puits contenant des hybridomes que le pourcentage d'hybridomes sécrétant des anticorps a été faible. Aucun hybridome produisant des anticorps réagissant spécifiquement avec un seul phage n'a été repéré. Dans un second temps, des phages recombinants ont servi d'immunogène. Des anticorps

dirigés contre le phage ont pu être détectés, mais aucune réactivité avec l'épitope inséré n'a été décelée. Finalement, des thymocytes fœtaux ont été utilisés comme immunogène. Les rendements obtenus suite aux deux fusions ont également été faibles et aucun anticorps de la spécificité désirée n'a pu être dépisté.

En conclusion, malgré la diversité des protocoles d'immunisations utilisés, il n'a pas été possible de produire de réactif spécifique à aucun des récepteurs visés. L'instabilité des hétérohybridomes ainsi que la fragilité du partenaire de fusion pourraient expliquer le petit nombre d'hybridomes obtenus. En immunisant avec des phages recombinants, il a cependant été possible de détecter une réactivité avec le phage, mais non avec l'épitope cible.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont en premier lieu à ma directrice de recherche, Suzanne Lemieux, d'une part pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, et d'autre part pour son soutien et son encadrement constant.

Je ne peux passer sous silence la collaboration d'Yvette Lusignan durant ces deux années. Ses conseils judicieux, son bon jugement, sa grande disponibilité et son apport technique inestimable au projet ont été grandement appréciés. Je remercie aussi Claire Beauchemin pour son aide dans l'isolement des thymus fœtaux.

J'aimerais également remercier mes compagnes de tous les jours, Anick et Annie, pour les services rendus et pour leur support moral incroyable. J'adresse des remerciements particuliers à une bonne amie, Marie-Pascale, qui a su être à l'écoute aux bons moments et pour ses encouragements continuels.

Mes remerciements vont aussi à celui qui partage ma vie, André, pour sa patience surhumaine et son inébranlable confiance en moi. Je remercie aussi mes parents et ma sœur qui m'ont supporté pendant ces deux années à la maîtrise.

J'aimerais finalement remercier le Fond FCAR pour son soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire..... i
Remerciements.....iii
Liste des figures..... vii
Listes des tableaux..... viii
Listes des abréviations..... ix
Introduction.....1
Revue bibilographique.....3

1. Fonctions biologiques des cellules NK.....3
    1.1 Caractéristiques générales des cellules NK.....3
    1.2 Caractère cytotoxiques des cellules NK.....3
        1.2.1 Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps.....4
        1.2.2 Cytotoxicité naturelle.....5
2. Phénotype des cellules NK..... 5
3. Phénomène de la reconnaissance de l'absence de soi.....6
4. Récepteurs NK impliqués dans la reconnaissance des molécules de classe I du CMH.....6
    4.1 Structure et caractéristiques des récepteurs ayant comme ligands des molécules de classe I du CMH.....7
    4.2 Famille de récepteurs Ly49..... 8
        4.2.1 Structure des molécules Ly49.....8
        4.2.2 Récepteurs d'activation.....12
        4.2.3 Récepteurs d'inhibition et mécanisme d'action..... 13
        4.2.4 Les molécules de classe I classique du CMH comme ligands des Ly49.....14
        4.2.5 Influence des molécules de classe I du CMH sur l'expression des Ly49.....15
        4.2.6 Source de diversité et distribution des molécules Ly49.....16
5. Classification.....17
6. Découverte des récepteurs L49E, F et H.....20
7. Importance relative des populations qui expriment les récepteurs Ly49E, Ly49F et Ly49H.....24
8. Récepteur Ly49E..... 26
    8.1 Cellules fœtales.....28
9. Récepteur Ly49F..... 29
10. Récepteur Ly49H..... 30
11. La famille de récepteurs NKG2..... 31
    11.1 Une molécule de classe I du CMH non-classique comme ligand des hétérodimères CD94/NKG2.....31
    11.2 Nécessité du peptide Qdm pour la reconnaissance de Qa-1^b par les récepteurs CD94/NKG2 murins.....31
    11.3 Les différentes molécules NKG2..... 32
        11.3.1 NKG2A..... 32

12. Problématique et objectif du projet.....33

Méthodologie.....35

I- Préparation des phages recombinants.....35
1. Choix des séquences.....35
2. Préparation des oligonucléotides.....35
3. Préparation du vecteur fUSE5.....38
4. Électroporation.....40
5. Test d'infectivité.....40
6. Séquençage.....41
7. Amplification des phages recombinants.....42

II- Préparation des cellules pour l'immunisation.....43
1. Enrichissement des cellules NK murines.....43
2. Production des cellules LAK.....44
3. Thymocytes fœtaux.....44
3.1 Accouplement.....44
3.2 Isolement des thymocytes fœtaux.....44
4. Analyse par cytométrie en flux.....45

III- Immunisation – Fusion.....46
1. Protocoles d'immunisation.....46
2. Fusion.....50
3. Test ELISA.....51

Résultats.....55

1. Avant propos.....55
2. Détermination des séquences insérées dans les phages recombinants.....56
3. ELISA.....66
4. Stratégies d'immunisation.....71
4.1 Utilisation des cellules LAK en tant qu'immunogènes.....73
4.1.1 Analyse des séra.....73
4.1.2 Fusions et criblage des surnageants d'hybridomes.....78
4.2 Utilisation des cellules LAK et des phages recombinants comme immunogènes.....81
4.2.1 Analyse des séra.....82
4.2.2 Fusions et criblage des surnageants d'hybridomes.....83
4.3 Utilisation des thymocytes fœtaux en tant qu'immunogènes.....87
4.3.1 Analyse cytofluorométrique.....87
4.3.2 Analyse des séra.....91
4.3.3 Fusions et criblage des surnageants d'hybridomes.....94

Discussion.....96

Conclusion..... 110

Liste de références..... 112

Annexe I..... 126

Annexe II..... 128

LISTES DES FIGURES

Figure 1. Organisation structurale des récepteurs de la famille Ly49 des cellules NK murines..... 9

Figure 2. Classification des récepteurs Ly49 exprimés chez la souris C57BL/6.....18

Figure 3. Réactivité des anticorps dirigés contre des molécules associées au groupe de récepteurs apparentés à Ly49C avant le début du projet..... 22

Figure 4. Séquences des oligonucléotides insérés dans le phage fUSE5.....36

Figure 5. Représentation schématique des diverses étapes du test de criblage ELISA.....53

Figure 6. Séquences en acides aminés de la portion extracellulaire des récepteurs Ly49 clonés chez la souris..... 58

Figure 7. Séquences en acides aminés de la portion extracellulaire des récepteurs CD94/NKG2..... 64

Figure 8. Établissement des conditions optimales d'utilisation des phages recombinants pour le test ELISA.....68

Figure 9. Fréquence des cellules exprimant le marqueur NK1.1 dans une culture de cellules LAK de B6, cultivées 9 jours en présence d'IL-2.....74

Figure 10. Analyse par cytométrie en flux de la réactivité des séra immuns avec des cellules LAK 76

Figure 11. Détermination, par cytométrie en flux, de la proportion des cellules NK et LAK réagissant avec les anticorps 4D12 (anti-Ly49E et C) et 4LO3311 (anti-Ly49C).....89

Figure 12. Détermination, par cytométrie en flux, de la proportion des thymocytes fœtaux exprimant le récepteur Ly49E.....92

Figure 13. État de la situation de tous les anticorps dirigés contre le groupe de récepteurs apparentés à Ly49C..... 105

LISTES DES TABLEAUX

Tableau I. Identité en nucléotides entre les régions codantes pour des gènes Ly49 exprimés chez la souris C57BL/6..... 21

Tableau II. Nombre de résidus uniques aux récepteurs concernés à des positions précises de la tige et du CRD par rapport au nombre total de résidus dans chacune des portions du domaine extracellulaire..... 25

Tableau III. Caractéristiques des constituants utilisés pour la production des phages recombinants.....39

Tableau IV. Calendrier d'immunisation des rat Fisher (F) avec des cellules LAK pour la production d'anticorps anti-Ly49 et CD94/NKG2..... 47

Tableau V. Calendrier d'immunisation des rat Fisher (F) et DA avec des cellules LAK et des phages pour la production d'anticorps anti-Ly49 et CD94/NKG2.....48

Tableau VI. Calendrier d'immunisation des rat Fisher (F) avec des thymocytes fœtaux pour la production d'anticorps anti-Ly49 et CD94/NKG2..... 49

Tableau VII. Conditions optimales pour le test ELISA..... 70

Tableau VIII. Conditions expérimentales pour les différentes fusions.....72

Tableau IX. Rendements obtenus pour les fusions impliquant les rats immunisés avec les cellules LAK.....80

Tableau X. Rendements obtenus pour les fusions impliquant les rats immunisés avec les cellules LAK et les phages..... 84

Tableau XI. Rendements obtenus pour les fusions impliquant les rats immunisés avec les thymocytes fœtaux.....95

Annexe I-

Tableau I. Concentration des phages contenant divers inserts suite à l'amplification.....126

Tableau II. Tableau récapitulatif de la purification et la concentration des oligonucléotides ET1, ET2, EC1, EC2, EC3, FT, FC, HT, HC, 2AT, CD94 et V.....128

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A_{260} :	absorbance spécifique à 260nm
A_{269}:	absorbance spécifique à 269nm
A_{280}:	absorbance spécifique à 280nm
A_{320}:	absorbance spécifique à 320nm
aa:	acide aminé
ABTS:	$C_{18}H_{16}N_4O_6S_4$-$(NH_4)_2$
Ac :	anticorps
AcMo:	anticorps monoclonal (aux)
ADCC:	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
ARNm:	acide ribonucléique messager
B6:	C57BL/6
CD:	"cluster of differentiation"
CMV:	cytomégalovirus
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
CRD:	"carbonhydrate recognition domain"
Da:	Dalton
D.O:	densité optique
°C:	degré Celsius
E. coli:	*Escherichia coli*
EDTA:	acide éthylène diamine tétraacétique
ELISA:	"enzyme-linked immunosorbent assay"
FITC:	isothiocyanate de fluorescéine
FR:	forme réplicative
GM-CSF:	facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages
HAT:	hypoxanthine aminoptérine thymidine
HT:	hypoxanthine thymidine
Ig:	immunoglobuline
IL:	interleukine
INF :	interféron
ITAM:	"immunoreceptor tyrosine-based activation motif"
ITIM:	"immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif"
Kb:	poids en kilobase
KDa:	kilo Dalton
KIR:	"killer cell inhibitory receptor"
LB:	"Luria broth"
LAK:	"lymphokine-activated killer"
µg:	microgramme
µl:	microlitre
mg:	milligramme
$MgCl_2$:	chlorure de magnésium
ml:	millilitre
mM:	millimolaire

NaOAc:	acétate de sodium
NaCl:	chlorure de sodium
NK:	cellule tueuse naturelle
NKC:	complexe NK
nm:	nanomètre
PBS:	tampon phosphate salin
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne
PEG:	polyéthylèneglycol
PMA:	"phorbol myristate acetate"
Qdm:	"Qa-1 determinant modifier"
RT-PCR:	PCR-transcriptase inverse
SHP:	protéine tyrosine phosphatase
SVF:	sérum de veau fœtal
TAE:	Tris-acétate de EDTA
TAP:	transporteur associé au traitement de l'antigène
TBS:	tampon Tris salin
TCR:	récepteur des cellules T
Tet:	hydrochloride tétracycline
TLP:	précurseur lymphoïde thymique
TNFα :	facteur nécrosant des tumeurs alpha
SA-HRP:	"streptavidine horseradish peroxydase"
SA-PE:	streptavidine peroxydase
TNF:	facteur de nécrose tumoral
U/ml:	unité par millilitre

INTRODUCTION

Découvertes en 1975, les cellules NK ont longtemps été négligées. Après que ces cellules aient été reconnues comme un troisième type de lymphocytes, les informations concernant leur fonctionnement n'ont pas cessé de s'accumuler. Jusqu'à maintenant, un grand nombre de récepteurs d'inhibition et de récepteurs d'activation ont été identifiés sur les cellules NK chez l'humain, la souris et le rat. Bien que la fonction de ces cellules commence à être mieux saisie, il n'en reste pas moins que l'hétérogénéité au sein de cette population rend leur caractérisation plus ardue.

Les anticorps monoclonaux (AcMo) comptent parmi les outils nécessaires pour l'analyse de ces récepteurs. Notre laboratoire a produit, il y a quelques années déjà, l'anticorps monoclonal 4LO3311 qui reconnaît de façon spécifique une sous-population de cellules NK murines (Lemieux *et al.*, 1991). L'antigène reconnu par cet anticorps a été identifié comme étant le récepteur Ly49C (Gosselin *et al.*, 1997). La fonction, la distribution cellulaire et tissulaire sont des informations précieuses recueillies à propos du récepteur Ly49C, grâce à cet anticorps. Malheureusement, des anticorps monoclonaux ne sont pas disponibles contre tous les récepteurs Ly49.

À ce jour, nous connaissons 23 membres de la famille Ly49 dont 10 seraient exprimés chez la souris C56BL/6 (B6). De ces 10 récepteurs, les récepteurs Ly49C, E, F, H, I et J font tous partie d'un même groupe. Sur la base de l'homologie en nucléotides, les récepteurs de ce groupe sont dits apparentés à Ly49C. En effet, au sein de ce groupe, l'homologie est supérieure à 85%. Voilà pourquoi la plupart des anticorps monoclonaux qui se lient à un récepteur de ce groupe ont une réactivité croisée avec au moins un autre membre. Par ailleurs, ces récepteurs étant exprimés sur des populations NK chevauchantes, une cellule peut donc exprimer donc plus d'un récepteur, ce qui complique davantage l'étude des propriétés d'un seul récepteur Ly49. Les récepteurs Ly49E, Ly49F et Ly49H, concernés par le projet, sont faiblement représentés dans la population NK.

Dans l'optique de caractériser les récepteurs Ly49E, F et H, la production d'anticorps monoclonaux contre chacun de ces récepteurs semblait nécessaire. Au début du projet, nous savions qu'un anticorps réagissant entre autres avec les récepteurs Ly49F et Ly49H avait été produit, mais ayant une multiréactivité, cet anticorps n'était pas d'une grande utilité. Par contre, aucun réactif n'était disponible pour le récepteur Ly49E. Les informations concernant ces trois récepteurs étaient par conséquent très limitées. Nous savions que les récepteurs Ly49E et Ly49F mais pas Ly49H, portaient, dans leur domaine cytoplasmique, un motif d'inhibition. Des anticorps monoclonaux spécifiques de ces récepteurs pourraient permettre de confirmer leurs propriétés fonctionnelles ainsi que leur distribution cellulaire, tissulaire et génétique. Comme la technique employée pour dépister des AcMo utilisait des phages recombinants, et que les séquences en acides aminés des récepteurs Ly49 d'intérêt sont très homologues, nous avons ajouté à notre étude le récepteur CD94/NKG2A. La séquence retenue pour ce récepteur présentait une très forte majorité d'acides aminés uniques à leurs positions. En plus d'avoir une séquence très différente, ce récepteur est assez fortement exprimé à la surface des cellules NK contrairement aux récepteurs Ly49E, Ly49F ou Ly49H.

Dans le contexte du présent projet, trois stratégies d'immunisation bien différentes ont été employées dans le but de provoquer une réponse immune contre les récepteurs Ly49E, Ly49F, Ly49H et CD94/NKG2A. Le criblage sélectif des surnageants d'hybridomes a été effectué grâce à des phages recombinants exprimant des séquences bien spécifiques de la portion extracellulaire des récepteurs concernés. Un test de criblage par ELISA a été mis au point pendant le projet.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Fonctions biologiques des cellules NK

1.1 Caractéristiques générales des cellules NK

Les cellules NK sont de grands lymphocytes granulaires dérivés de la moelle osseuse. Ces cellules se retrouvent dans plusieurs compartiments lymphoïdes et non-lymphoïdes tels que la rate, le foie, et les poumons mais elles sont peu abondantes dans les ganglions lymphatiques (Rolstad, Herberman et Reynolds, 1986). Elles s'accumulent également dans l'utérus en début de grossesse (Whitelaw et Croy, 1996). Ces cellules, appelées "natural killer" par Kiessling et collaborateurs (Kiessling *et al.*, 1975), ont été décrites à l'origine, comme ayant une habileté innée à tuer des cellules tumorales ainsi que des cellules infectées par des virus ou des bactéries (Herberman, 1982; Welsh, 1978; Bancroft, 1993). Contrairement aux cellules B et T qui ont besoin d'une phase de prolifération et de différenciation pour devenir des effecteurs de l'immunité, la réponse NK est immédiate ce qui permet de répondre rapidement aux agresseurs.

Subséquemment, il a été observé que les cellules NK pouvaient lyser certaines cellules normales, particulièrement des cellules hématopoïétiques dont les molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) étaient altérées ou réduites. Par contre, elles ne lysent pas les cellules normales d'un même hôte (Rolstad et Seaman, 1998). Outre leur capacité lytique, les cellules NK peuvent aussi exercer leur activité fonctionnelle en produisant des cytokines. Les cellules NK participent donc à la défense de l'hôte contre les invasions par des microorganismes et à la surveillance anti-tumorale.

1.2. Caractère cytotoxique des cellules NK

Les cellules NK représentent 4% à 10% des cellules lymphoïdes de l'organisme. Elles induisent, sans immunisation préalable, la lyse des cellules cibles selon deux voies : la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et la cytotoxicité dite naturelle. Que l'une ou l'autre des voies soit utilisée, lors d'une rencontre entre la cellule NK et la cellule cible, il y a activation initiale par certains récepteurs, qui conduit à une

mobilisation de calcium et à l'activation par phosphorylation d'une variété de kinases (Windebank *et al.*, 1988; Cone *et al.*, 1993). Ces kinases vont ensuite activer des cascades de signalisation qui mènent à un repositionnement de l'appareil de Golgi et à une réorganisation des microtubules à l'intérieur de la cellule NK. Il se produit alors une sécrétion polarisée de granules cytotoxiques (Kupfer et Singer, 1989; Berke, 1994). Le relâchement du contenu des granules (perforine et granzymes) conduit à la mort de la cellule cible (Eriksson *et al.*, 1999a; Solana et Mariani, 2000). En plus des réarrangements intracytoplasmique lors de la lyse naturelle, il y a une accumulation de récepteurs d'activation spécifiques et de protéines structurales au point de contact entre les deux cellules (Carpen *et al.*, 1983). Tel que démontré dans le cas de Ly49A, il y a également une accumulation de récepteurs d'inhibition au point de contact lorsque la cellule NK rencontre une cellule cible du soi et qu'il n'y a pas de lyse (Eriksson *et al.*, 1999b). Même si l'exocytose granulaire est le mécanisme lytique le plus employé, les cellules NK activées peuvent également exercer leur cytotoxicité par un mécanisme non-sécréteur via des interactions de type Fas-Fas Ligand (Solana et Mariani, 2000).

1.2.1 Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) est un mécanisme lytique qui ne requiert pas de récepteurs spécifiques d'un antigène de la part de la cellule effectrice. La molécule de surface CD16 (FcγRIIIA) est la structure transmembranaire qui reconnaît et interagit directement avec le fragment Fc des anticorps recouvrant la cellule cible. Cette glycoprotéine est exprimée à la surface des cellules NK humaines et murines sous forme multimérique en association avec les molécules CD3ζ et FcεR1γ. Ce sont ces deux molécules qui permettent l'expression à la surface du récepteur et la transduction des signaux (Lanier, 1998; Vély et Vivier, 1996). Suite à l'engagement de CD16, il y a phosphorylation et activation des protéines tyrosine kinases proximales. Une fois activées, ces kinases (ZAP-70, Syk, Lck, LAT), en association avec des molécules adaptatrices (Vav, Sos, Grb2), vont promouvoir et réguler les fonctions spécifiques des cellules NK menant à la mort cellulaire de la cellule cible (Chini et Leibson, 2000).

Cependant, il est clair que l'ADCC n'est qu'un des mécanismes par lequel les cellules NK peuvent reconnaître et tuer une cellule étrangère. Le récepteur Fc n'est ainsi pas requis pour la cytotoxicité dite naturelle. D'autres récepteurs, qui ne sont pas encore complètement caractérisés et dont certains reconnaissent des molécules de classe I du CMH, jouent un rôle dans l'activation des cellules NK.

1.2.2 Cytotoxicité naturelle

La cytotoxicité naturelle se produit donc sans l'intermédiaire d'anticorps. Son déclenchement et sa régulation s'effectuent par deux mécanismes complémentaires. Le premier implique une multitude de récepteurs d'activation à la surface des cellules NK et le second implique un signal négatif, exercé par les récepteurs d'inhibition, qui empêche la lyse des cellules cibles (Vély et Vivier, 1996). Une hypothèse courante est qu'autant la présence du ligand que son arrangement spatial au niveau de la membrane de la cellule cible pourrait déterminer la sensibilité d'une cellule cible à la lyse par les cellules NK (Rolstad et Seaman, 1998).

2. Phénotype des cellules NK

Lorsqu'il a été possible d'identifier les lymphocytes B et T à l'aide de marqueurs de surface, il a été établi que les cellules NK étaient bien distinctes de ces deux populations. Majoritairement de phénotype $CD3^-$ $CD4^-$ $CD8^-$ $CD16^+$ $NK1.1^+$, les cellules NK murines ne possèdent pas les récepteurs d'antigène se trouvant à la surface des cellules B et T, soit les immunoglobulines de surface et le TCR. Sur les cellules T, le TCR est exprimé en association avec le complexe moléculaire CD3. Même si les cellules NK expriment la chaîne ζ de ce complexe, elles n'expriment pas d'ARNm pour un TCR mature et ne réarrangent pas les gènes du TCR (Yokoyama et Seaman, 1993).

3. Phénomène de la reconnaissance de l'absence de soi

Ces observations phénotypiques sur les cellules NK indiquent qu'elles doivent reconnaître une structure sur la cellule cible par des récepteurs qui diffèrent du TCR. Alors que les cellules T reconnaissent des peptides antigéniques présentés dans le contexte de molécules du CMH du soi, les cellules NK lysent plus efficacement les cellules cibles qui n'expriment pas de molécules de classe I du CMH (Yokoyama et Seaman, 1993). Donc, les cellules NK pourraient être activées par des cellules cibles qui ont perdu l'expression des molécules de classe I du CMH tel que proposé par Ljunggren et Kärre (Ljunggren et Kärre, 1985).

Cette hypothèse, connue sous la désignation de « missing self », propose que les cellules NK puissent être activées autant par une cellule cible du soi que par une cellule étrangère, mais que la réponse contre une cellule autologue soit normalement prévenue par une reconnaissance des molécules de classe I du CMH de l'individu (Ljunggren et Kärre, 1990). Cette hypothèse a permis de comprendre pourquoi la cellule NK était en mesure de reconnaître une grande variété de cellules étrangères normales ainsi qu'un large spectre de cellules tumorales ou de cellules infectées par les virus qui expriment des niveaux réduits de molécules de classe I du CMH (Kärre *et al.*, 1986).

Aujourd'hui cette théorie a été confirmée par l'identification de récepteurs d'inhibition chez la souris, le rat et l'humain. Ces récepteurs sont exprimés de façon préférentielle sur les cellules NK, et inhibent les fonctions cytotoxiques NK lorsqu'ils se lient à un ligand approprié.

4. Récepteurs NK impliqués dans la reconnaissance des molécules de classe I du CMH

Les mécanismes utilisés par les cellules NK pour discriminer entre une cellule cible sensible et résistante ont commencé à être compris au moment où des observations montrant que les cellules NK expriment des récepteurs d'activation (ayant ou non comme ligand des molécules de classe I du CMH) et d'inhibition ont été rapportées. Ceux qui se

lient à des molécules de classe I du CMH appartiennent à trois groupes de récepteurs: les familles des récepteurs Ly49, KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) et CD94/NKG2.

Étant donné la diversité des récepteurs d'activation et la large distribution de leurs ligands, le programme lytique de la cellule NK est généralement activé par défaut. L'activation est renversée lorsqu'un signal inhibiteur est enclenché. Le sort ultime d'une cellule cible est donc déterminé par la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs (Höglund *et al.*, 1997; Yokoyama, 1997). En règle, les signaux générés par l'engagement des récepteurs d'inhibition dominent par rapport aux signaux d'activation (Raulet et Held, 1995).

4.1 Caractéristiques des récepteurs ayant comme ligands des molécules de classe I du CMH

Chez les cellules NK de rongeurs, les récepteurs de surface qui peuvent transmettre des signaux d'activation et d'inhibition sont surtout des protéines transmembranaires de type II, ayant l'extrémité amino-terminale du côté intracellulaire, et qui sont exprimées sous forme de dimères. Leur portion extracellulaire contient un domaine de liaison à des sucres (CRD) qui fait que ces molécules sont apparentées à la superfamille des lectines de type C. Ces récepteurs ne sont pas considérés comme des membres en règle de cette superfamille puisqu'ils ne possèdent pas le site de fixation du calcium (Weis, Taylor et Drickamer, 1998). Chez la souris, les récepteurs apparentés aux lectines de type C sont codés par des familles de gènes situées sur le chromosome 6. Chez le rat et l'humain, ces récepteurs sont codés par des régions synthéniques. Parce que les récepteurs codés par ces gènes sont exprimés sur les cellules NK, on appelle cette région le complexe des gènes NK (NKC). Le NKC, couvre une région de 4 Mb qui inclut notamment les récepteurs Ly49 (souris et rat), NKR-P1 (souris, rat et humain) (Yokoyama *et al.*, 1991; Giorda *et al.*, 1990; Lanier, Chang et Phillips, 1994), NKG2 (souris, rat et humain) (Silver, Lau et Kane, 1999; Lohwasser *et al.*, 1999; Dissen, Westgaard et Fossum, 1998) de même que les gènes CD94 (souris, rat et humain) (Vance *et al.*, 1997; Ryan et Seaman 1997; Dissen *et al.*, 1997; Plougastel et Trowsdale, 1997;

Berg *et al.*, 1998; Houchins *et al.*, 1991) et CD69 (souris et humain) (Ziegler, 1994; Lopez-Cabresa *et al.*, 1993).

Un seul gène non-fonctionnel apparenté aux récepteurs Ly49 a été identifié chez l'humain (Westgaard *et al.*, 1998; Barten et Trowsdale, 1999). Les cellules NK humaines utilisent surtout un groupe de récepteurs distincts au point de vue structural pour la reconnaissance des molécules de classe I classiques du CMH. Ces récepteurs humains, nommés KIR, généralement monomériques en ce qui a trait aux récepteurs d'inhibition, appartiennent à la superfamille des immunoglobulines.

4.2 Famille des récepteurs Ly49

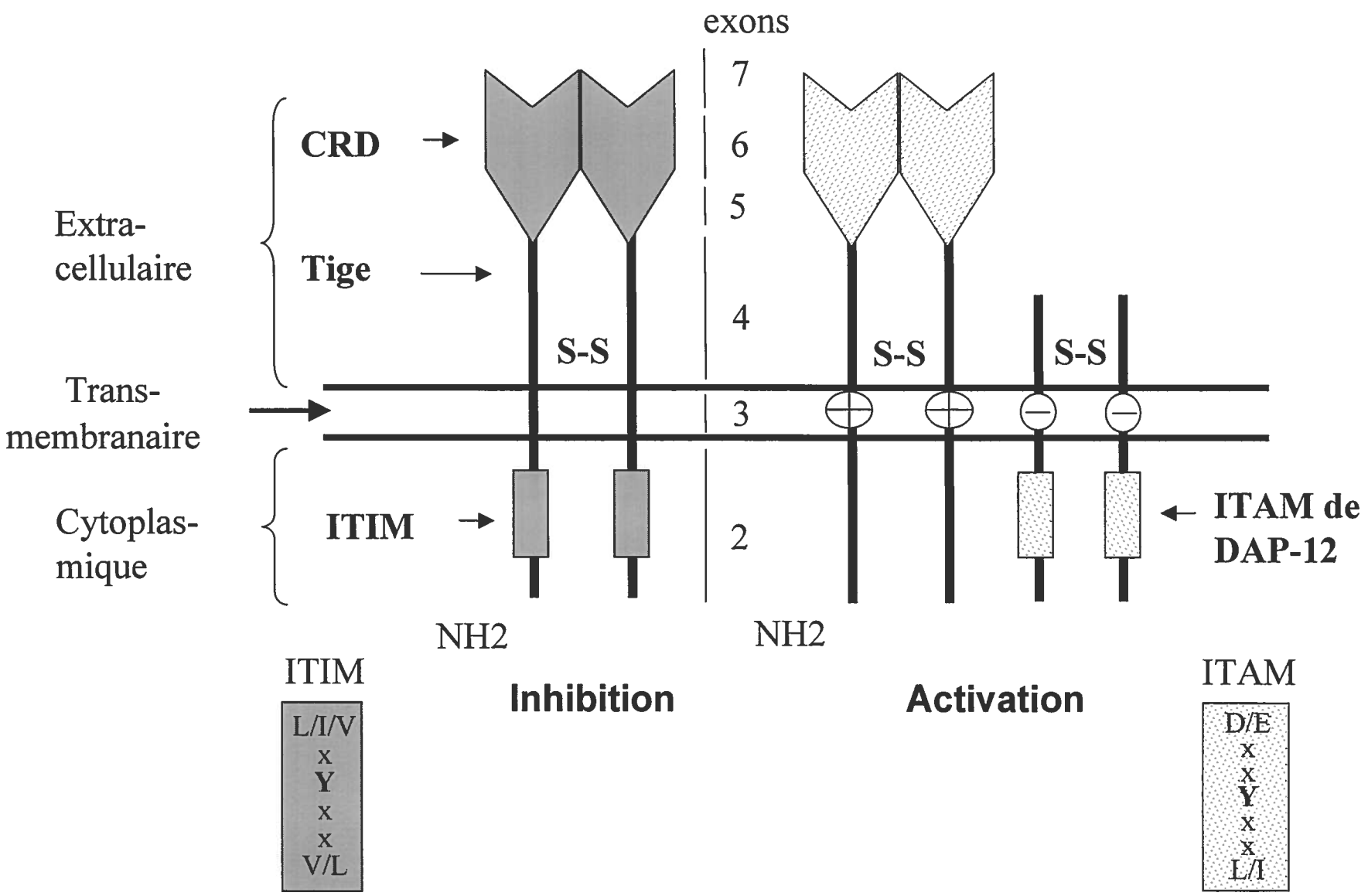
Les récepteurs d'activation et d'inhibition concernés par ce mémoire appartiennent plus particulièrement à la famille Ly49. Cette famille est responsable de la reconnaissance des molécules de classe I classiques du CMH sur une cellule cible.

4.2.1 Structure des molécules Ly49 et mécanisme d'action

La famille Ly49 murine contient au moins 23 membres (Ly49A à Ly49W) (Yokoyama *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 1991; Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994; Brennan *et al.*, 1994; McQueen *et al.*, 1998; Makrigiannis *et al.*, 1999; Makrigiannis *et al.*, 2000; Silver *et al.*, 2001) et trois récepteurs ont été clonés chez le rat soit Ly49.9, Ly49.12 et Ly49.29 (Dissen *et al.*, 1996). Tous les membres identifiés jusqu'à maintenant présentent une organisation structurale commune (Figure 1), c'est-à-dire un domaine extracellulaire, composé du CRD et de la tige, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire. L'analyse génomique du récepteur Ly49A a révélé que les domaines cytoplasmique (exon 2), transmembranaire (exon 3) et la tige (exon 4) étaient codés chacun par un seul exon. Par contre, le CRD est codé par trois exons soit les exons 5, 6 et 7 (Kubo *et al.*, 1993). C'est la portion intracellulaire qui confère la fonction activatrice ou inhibitrice. Dans le cas du récepteur d'inhibition, des séquences cytoplasmiques nommées ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)

Figure 1. Organisation structurale des récepteurs de la famille Ly49 des cellules NK murines.

Les récepteurs Ly49 comprennent trois domaines bien distincts: le domaine cytoplasmique, le domaine transmembranaire et le domaine extracellulaire composé de la tige et du CRD. Des différences majeures existent entre les récepteurs d'activation et ceux d'inhibition. Les récepteurs d'activation ont un résidu chargé positivement dans le domaine transmembranaire, ce qui leur permet de s'associer par opposition de charge avec la molécule adaptatrice DAP12. C'est grâce au motif ITAM de DAP12, que se produisent les signaux intracellulaires menant à la mort de la cellule cible. Cependant, tous les récepteurs d'inhibition possèdent un motif ITIM qui enclenche la signalisation intracellulaire qui interfère avec l'activation de la cellule NK et par conséquent assure la protection de la cellule cible.


exons
7
6
5
4
3
2
CRD
Tige
Extra-
cellulaire
Trans-
membranaire
Cytoplas-
mique
S-S
S-S
S-S
ITIM
ITAM de
DAP-12
NH2
NH2
ITIM
L/I/V
x
Y
x
x
V/L
Inhibition
Activation
ITAM
D/E
x
x
Y
x
x
L/I

(L/I/V)xYxx(V/L) transmettent les signaux de régulation négative de l'activation cellulaire (Olivero, Bléry et Vivier, 1998). Dans le cas du récepteur d'activation, ce sont des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) (D/ExxYxxL/I), situés non pas sur le récepteur Ly49 même mais situés dans la portion cytoplasmique de la molécule adaptatrice DAP12, qui induisent l'activation des cellules NK (Mason *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998). La présence d'un acide aminé chargé positivement (arginine ou lysine) dans le domaine transmembranaire des récepteurs d'activation permet l'association, par opposition de charge, avec un acide aminé chargé négativement (résidu d'acide aspartique) présent dans le domaine transmembranaire de DAP12. Cette interaction permet non seulement l'engagement du récepteur d'activation mais aussi son expression en surface cellulaire (Smith *et al.*, 1998).

Suite à la liaison d'un récepteur Ly49 à son ligand, il s'ensuit une série d'événements intracellulaires qui se soldent soit par l'activation des fonctions cytotoxiques soit par l'inhibition de l'activité NK et ce dépendamment du motif intracellulaire porté par le récepteur ou la protéine adaptatrice qui lui est associée. Lors de la rencontre du récepteur d'activation avec son ligand, les résidus tyrosine de l'ITAM sont phosphorylés ce qui entraîne le recrutement des protéines kinases telles que Syk et ZAP-70 (Lanier *et al.*, 1998), ce qui a comme conséquence l'activation des fonctions cellulaires.

Par ailleurs, l'engagement des récepteurs d'inhibition implique le motif ITIM et l'action de phosphatases. Suite à la liaison de la portion extracellulaire avec une molécule de classe I du CMH, le ou les résidus tyrosine de l'ITIM sont phosphorylés possiblement par les kinases de la famille *src*, entraînant le recrutement de la phosphatase SHP-I, ce qui bloque l'activité des kinases enclenchée par un récepteur d'activation situé à proximité du récepteur d'inhibition et ayant son ligand sur la cellule cible (Nakamura *et al.*, 1997). Le rôle de la phosphatase SHP-1 dans la fonction des récepteurs d'inhibition NK a été démontré chez des souris *motheaten*, qui sont déficientes pour l'activité SHP-1 (Tsui *et al.*, 1993; Shultz *et al.*, 1993). Les cellules NK de ces souris expriment des niveaux normaux de récepteurs Ly49, mais les récepteurs sont grandement déficients dans leur

fonction inhibitrice (Nakamura *et al.*, 1997). Les molécules Ly49 sont également en mesure de recruter SHP-2 dont la fonction est toutefois controversée (Olcese *et al.*, 1996). Il est à noter que l'engagement des récepteurs d'inhibition peut souvent annuler les signaux d'activation, ce qui suggère que la résultante d'une interaction cellule NK-cellule cible pourrait être déterminée par la balance des deux types de signaux (Raulet et Held, 1995).

4.2.2 Récepteurs d'activation

Il existe une très grande diversité de récepteurs d'activation exprimés par les cellules NK dont les récepteurs de co-activation CD2, CD28, CD44 et CD69 (revue par Lanier, 1998). Certains récepteurs apparentés aux lectines de type-C soit NKR-P1A chez le rat et NKR-P1C (NK1.1) chez la souris, CD94/NKG2C, et entre autres Ly49D, Ly49H, Ly49L, Ly49P et Ly49W ont été impliqués dans les fonctions activatrices des cellules NK (Ryan *et al.*, 1991; Ryan *et al.*, 1995; Karlhofer et Yokoyama, 1991). Ils ont une courte queue cytoplasmique sans motif ITIM, et des acides aminés chargés dans leur domaine transmembranaire ce qui leur permet de s'associer à des protéines adaptatrices à ITAM. Il est à noter que chez la souris et le rat, le NKR-P1B est un récepteur d'inhibition (Carlyle *et al.*, 1999). L'activation du récepteur NK1.1 par pontage à l'aide d'anticorps monoclonaux (AcMo) spécifiques a non seulement provoqué une augmentation du calcium intracellulaire mais a aussi permis la lyse redirigée des cellules cibles exprimant des récepteurs Fc (Karlhofer et Yokoyama 1991). Pour certains récepteurs d'activation les ligands sont connus. Notamment, les récepteurs Ly49D, Ly49P et Ly49W peuvent reconnaître des molécules de classe I du CMH (Nakamura *et al.*, 1999; Silver *et al.*, 2000; Silver *et al.*, 2001). Même s'il est possible de stimuler les cellules NK via ces récepteurs, le rôle des récepteurs d'activation Ly49 dans la régulation des fonctions NK *in vivo* n'est pas encore bien établi (Lanier, 2000).

4.2.3 Récepteurs d'inhibition et mécanisme d'action

Le premier récepteur Ly49 a d'abord été décrit par Chan et Takei comme un récepteur potentiel des cellules T (Takei, 1983; Chan et Takei, 1986). Plus tard, une autre équipe a montré que la molécule trouvée chez la souris, renommée Ly49A suite à l'identification de récepteurs homologues, fonctionne en tant que récepteur d'inhibition reconnaissant des molécules de classes I du CMH sur les cellules NK (Karlhofer, Ribaudo et Yokoyama, 1992). Ces chercheurs ont démontré que Ly49A est exprimé sur un sous-groupe de cellules NK et qu'il empêche la lyse de certaines cellules cibles qui expriment des antigènes précis de classe I du CMH. Cette observation a été confirmée en renversant l'effet inhibiteur par le blocage de l'interaction récepteur-ligand avec des anticorps dirigés soit contre le récepteur soit contre le ligand. Depuis, plusieurs autres récepteurs Ly49 ayant des propriétés d'inhibition ont été rapportés.

Que les récepteurs NK murins d'inhibition appartiennent ou non à la famille de récepteurs Ly49, ils utilisent une stratégie commune pour empêcher l'activation des cellules NK. Un indice concernant leur mécanisme d'action dérive de l'observation que les récepteurs d'inhibition sur les cellules NK inhibent la signalisation de façon locale dans la cellule (Rolstad et Seaman, 1998). D'abord, ces récepteurs inhibent l'activation en *trans*. De plus, seuls les récepteurs d'activation coengagés avec des récepteurs d'inhibition vont être inhibés. Récemment, une équipe a démontré qu'une cellule NK déjà fixée à une cellule résistante à la lyse pouvait simultanément s'attacher à une cellule cible sensible et la tuer (Eriksson *et al.*, 1999b). Donc, même si les signaux inhibiteurs exercés par les récepteurs Ly49 peuvent prévenir plusieurs types de réponses effectrices, ils n'inhibent pas globalement les fonctions cellulaires. Le signal inhibiteur est plutôt restreint au niveau spatial envers les cellules cibles résistantes. Par ailleurs, une étude récente a montré qu'il y avait un effet synergique d'inhibition suite à l'engagement des récepteurs d'inhibition Ly49A et Ly49G2 chez une souris double transgénique (Hanke et Raulet, 2001). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que des récepteurs NK humains KIR étaient en mesure de provoquer un regroupement de molécules de classe I du CMH au point de contact sur la cellule cible. De cette façon, il y a formation de synapse

d'inhibition lors de la rencontre d'une cellule NK humaine avec une cellule cible (Davis *et al.*, 1999).

De plus, il semble que l'inhibition de la lyse naturelle requiert la co-localisation spatio-temporelle de récepteurs d'inhibition et d'activation. Parce que l'inhibition implique la perturbation de la phosphorylation sur les résidus tyrosine, les récepteurs d'inhibition pourraient renverser de façon locale l'activation en stimulant une phosphatase, ce qui contrecarre l'activité des phosphokinases (Nakamura *et al.*, 1997).

4.2.4 Les molécules de classe I classiques du CMH comme ligands des Ly49

En général, l'expression de molécules de classe I du CMH sur une cellule cible est en corrélation avec la résistance à la lyse par les cellules NK autologues. La transfection de cellules susceptibles à la lyse avec des ADNc de molécules de classe I du CMH de différents haplotypes, a permis dans certains cas de rendre ces cellules résistantes. C'est de cette façon que l'équipe de Yokoyama a réussi à déterminer que le récepteur Ly49A, avait comme ligand H-2D^d (Karlhofer, Ribaudo et Yokoyama, 1992).

La liaison récepteur-ligand implique des régions bien précises autant des molécules de classe I du CMH que des molécules Ly49. Des études avec Ly49A ont montré que des anticorps dirigés contre les domaines α1 et α2 du ligand D^d, qui forment la niche peptidique, et non α3, inhibaient l'adhésion exercée via Ly49A (Karlhofer, Ribaudo et Yokoyama, 1992). Par ailleurs, autant le CRD que la tige sont impliqués dans la liaison du récepteur Ly49C au ligand H-2K^b (Brennan *et al.*, 1996b).

La spécificité pour les molécules de classe I du CMH de certains membres de la famille Ly49 a été déduite de nombreux essais incluant des tests de cytotoxicité, la formation de conjugués et des analyses de cytométrie en flux avec des molécules de classe I du CMH solubles ou des tétramères. Il existe des ligands reconnus par de multiples récepteurs, incluant des récepteurs ayant des fonctions antagonistes. Par exemple, la molécule de classe I H-2D^d est reconnue à la fois par les récepteurs

d'inhibition Ly49A, C et G2 ainsi que par le récepteur d'activation Ly49D (Olsson-Allheim *et al.*, 1997; George *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2000). D'autre part, certains récepteurs ont une multiplicité de ligands. Plus particulièrement, le récepteur Ly49C se fixe à un large spectre de ligands avec une affinité variable (Brennan *et al.*, 1994; Hanke *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 1999). Cependant, certains récepteurs Ly49 n'ont pas encore de ligand connu. Dans notre laboratoire, un tout nouveau modèle d'étude de l'interaction entre certains récepteurs Ly49 et leurs ligands a été mis au point. Ce système permet d'étudier la fonctionnalité de ces interactions (Chalifour *et al*, 2001 manuscrit soumis).

4.2.5 Influence des molécules de classe I du CMH sur l'expression des récepteurs Ly49

Le niveau d'expression de certains récepteurs Ly49, particulièrement Ly49A est plus élevé chez les souris qui n'expriment pas de ligand de ce récepteur (Karlhofer *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 1995). Il y a donc une corrélation inverse entre le niveau d'expression d'un récepteur et son ligand. Ce phénomène a permis à certains chercheurs de proposer que l'équilibre entre la densité du récepteur et la densité des molécules de classe I du CMH pourrait être un facteur déterminant dans les fonctions inhibitrices des récepteurs Ly49. Cette observation a conduit à l'élaboration de la théorie de la calibration (Sentman *et al.*, 1995) selon laquelle les cellules NK portant un nombre réduit de récepteurs ont une plus forte sensibilité pour la détection et la lyse de cellules cibles ayant une expression réduite du ligand approprié. L'inhibition de la voie cytotoxique, une fois induite par l'interaction entre le récepteur d'activation et son ligand, requiert un nombre suffisant d'interactions entre les récepteurs d'inhibition Ly49 et leurs ligands. Si de telles interactions se produisent au-dessus d'un seuil donné, le signal négatif va inhiber le programme lytique (Olcese *et al.*, 1996). Donc, l'expression réduite du récepteur imposée par la présence du ligand de l'hôte a converti la cellule NK en un instrument de surveillance très utile, qui peut ainsi détecter une réduction modérée de l'expression des molécules de classes I sur la cellule cible potentielle (Höglund *et al.*, 1997). Il est à noter que ce modèle est sujet à controverse (Manilay, Waneck et Sykes, 1999).

4.2.6 Source de diversité et expression des molécules Ly49

Outre le fait que la famille Ly49 soit multigénique, la diversité des récepteurs Ly49 est aussi attribuable à l'épissage alternatif de certains gènes. Par ailleurs, la recombinaison de gènes ou d'exons provenant de gènes différents ainsi que la duplication des gènes sont sources de diversité au sein de la famille murine Ly49 (Makrigiannis et Anderson, 2000). La diversité du répertoire peut également être attribuée au polymorphisme allélique (Yokoyama, 1998). En effet, de façon prédominante un des deux allèles du gène *Ly49a*, par exemple, est exprimé, c'est pourquoi l'expression des gènes Ly49 est qualifiée de monoallélique (Held, Roland et Raulet, 1995; Held et Kunz, 1998).

Les récepteurs Ly49 ne sont pas distribués de façon clonale sur les cellules NK. Ils sont plutôt exprimés de façon concomitante ce qui fait que souvent plus d'un membre des Ly49 est présent à la surface d'une seule cellule. La plupart des cellules NK expriment simultanément deux ou plusieurs récepteurs Ly49 (Brennan *et al.*, 1994; Held, Roland et Raulet, 1995; Mason *et al.*, 1996; Held *et al.*, 1996; Kubota *et al.*, 1999; Takei *et al.*, 2001). Chaque récepteur Ly49 est exprimé sur une sous-population de cellule NK qui représente au maximum 60% de la population totale. C'est grâce à l'utilisation d'AcMo qu'on a pu découvrir que les cellules NK peuvent co-exprimer plusieurs récepteurs (Höglund *et al.*, 1997). Cependant, cette coexpression complique sérieusement l'étude sélective d'un seul récepteur.

Des récepteurs réagissant avec les molécule du CMH du soi et ceux qui réagissent avec des molécules du CMH allogéniques sont souvent co-exprimés, ce qui suggère que l'acquisition d'un récepteur n'est pas dirigée par les molécules de classe I du CMH de l'hôte (expression aléatoire) bien que l'haplotype de l'hôte ait une influence certaine sur l'expression des récepteurs NK. Les cellules NK qui ne sont pas en mesure d'exprimer un récepteur spécifique pour une molécule de classe I du CMH du soi ne se développent pas. Un tel procédé semble nécessaire afin d'éviter l'émergence des cellules NK auto-réactives. L'expression aléatoire et indépendante des récepteurs à CMH de classe I

procure une hétérogénéité clonale au sein du compartiment des cellules NK (Held *et al.*, 1999).

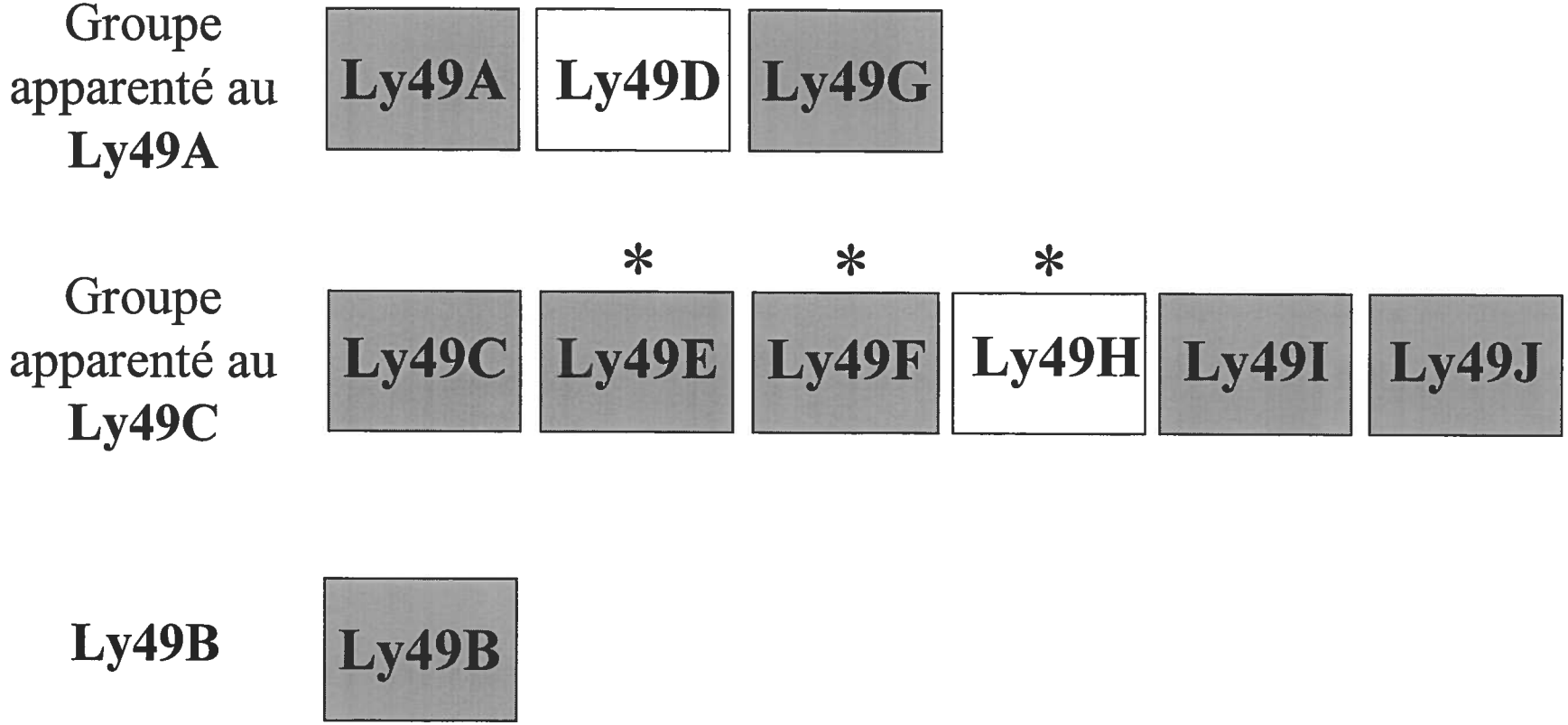
L'expression de plusieurs récepteurs avec différentes spécificités pour des molécules de classe I du CMH devrait donc générer des cellules NK avec divers patrons de reconnaissance. L'analyse clonale du développement des cellules NK *in vivo* à partir des précurseurs de la moelle osseuse a permis de préciser la cinétique d'expression des récepteurs Ly49. Les molécules Ly49B seraient exprimées en premier suivies de Ly49G puis de Ly49C et I et finalement Ly49A, D, E et F (Williams *et al.*, 2000).

5. Classification des récepteurs Ly49

Parmi les 23 membres connus, la majorité des molécules Ly49 font partie du groupe de récepteurs qui ont potentiellement la capacité d'exercer des fonctions d'inhibition. Il est à noter que cette classification est basée principalement sur les caractéristiques structurales des récepteurs (présence d'un motif ITIM, présence d'un acide aminé chargé transmembranaire) ainsi que sur des études effectuées avec des cellules transfectées. De cette façon, on a pu établir que les récepteurs Ly49A, B, C, E, F, G, I, J, O, Q, S, T et V ont le potentiel d'être des récepteurs d'inhibition tandis que les récepteurs Ly49D, H, L, M, P, R, U et W pourraient plutôt être des récepteurs d'activation. Par ailleurs, il a aussi été possible d'établir des groupes basés sur l'homologie de séquence en acides aminés. Sur cette base on distingue trois groupes chez la souris C57BL/6 (B6) (Figure 2). Un premier groupe apparenté au récepteur Ly49A compte comme membres les récepteurs Ly49A, D et G, ces trois récepteurs étant assez bien caractérisés. Le second groupe apparenté à Ly49C inclut les récepteurs Ly49C, E, F, H, I et J. Finalement, le troisième groupe compte pour l'instant un seul membre soit Ly49B. L'arbre philogénique récemment construit confirme ces regroupements (Takei *et al.*, 2001). Les récepteurs Ly49K, Ly49L, Ly49M et Ly49N, clonés chez B6, sont tous considérés comme des pseudogènes c'est pourquoi ils ne sont pas considérés dans l'étude (McQueen *et al.*, 1999; Makrigiannis et Anderson, 2001). Bien que sa séquence soit disponible dans GeneBank (# AB033769), le récepteur Ly49Q dont l'ADNc a été cloné

Figure 2. Classification des récepteurs Ly49 exprimés chez la souris C57BL/6

Les boîtes pâles représentent les récepteurs d'activation tandis que les boîtes foncées représentent ceux qui ont la structure des récepteurs d'inhibition. Les astérisques indiquent les récepteurs concernés par le présent projet.


Groupe apparenté au Ly49A
Ly49A
Ly49D
Ly49G
Groupe apparenté au Ly49C
*
*
*
Ly49C
Ly49E
Ly49F
Ly49H
Ly49I
Ly49J
Ly49B
Ly49B

en entier chez B6 n'a encore fait l'objet d'aucune publication. Étonnamment, tous les récepteurs avec ITIM du groupe apparenté à Ly49C ont aussi un acide aminé chargé positivement dans le domaine transmembranaire, mais cette charge ne se retrouve pas à la même position que dans le cas des récepteurs d'activation (Smith, Karlhofer etYokoyama 1994; Brennan *et al.*, 1996b; McQueen *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'homologie en nucléotides dans ce groupe va de 85 à 97% (Tableau I). À l'intérieur de ce groupe, c'est le récepteur Ly49C qui a pu être le mieux étudié, beaucoup, grâce à la disponibilité d'AcMo réagissant avec ce récepteur. La figure 3 illustre la réactivité des anticorps dirigés contre les récepteurs apparentés à Ly49C. À l'exception de l'anticorps 4LO3311 qui réagit uniquement avec le récepteur Ly49C, tous les autres AcMo reconnaissant des molécules de ce groupe se lient à plus d'un récepteur.

On remarque également qu'il n'y a pas d'anticorps réagissant avec le récepteur Ly49E. En outre, un des anticorps reconnaît Ly49F et Ly49H, mais cet AcMo est d'utilité limitée puisqu'il réagit avec plusieurs autres récepteurs (Corral *et al.*, 1999). L'absence d'anticorps spécifiques reconnaissant sélectivement les récepteurs Ly49E, F et H a fait en sorte que nous nous sommes intéressés plus particulièrement à ces trois récepteurs. Les récepteurs Ly49I et Ly49J ne sont pas considérés dans l'étude puisqu'ils présentent notamment des niveaux d'homologie, entre eux et avec Ly49C, beaucoup trop élevés.

6. Découverte des récepteurs Ly49E, F et H

Le premier membre de la famille de récepteurs Ly49 a été identifié en 1990 (Yokoyama *et al.*, 1990) et il a été nommé Ly49A. Par la suite, les récepteurs Ly49B et Ly49C (Wong *et al.*, 1991; Brennan *et al.*, 1994) ont été clonés à partir de banques d'ADNc de poumons de souris (B6 x CBA)F1. Puis, Smith et collaborateurs (1994) ont isolé des ADNc codant pour des molécules homologues à Ly49A à partir d'une banque d'ADNc de cellules LAK de B6. La détection d'ARNm pour de multiples molécules reliées à Ly49A dont Ly49E et Ly49F, a été rapportée. L'homologie en nucléotides des récepteurs Ly49E et F étant plus forte avec le récepteur Ly49C qu'avec le récepteur Ly49A, aujourd'hui ces récepteurs sont classés dans le groupe apparenté à Ly49C.

Tableau I. Identité en nucléotides entre les régions codantes pour des gènes Ly49 exprimés chez la souris C57BL/6.

Ly49	A	B	C	D	E	F	G2	H	I	J
A	-	69.8	80.7	88.2	82.8	82.3	87.7	77.9	80.7	80.5
B	-	-	70.9	68.9	69.9	70.9	70.8	69.7	70.9	69.8
C	-	-	-	76.8	**89.1**	**90.9**	80.0	**90.5**	95.9	96.3
D	-	-	-	-	78.8	78.3	84.3	78.6	77.8	76.6
E	-	-	-	-	-	**91.9**	81.8	**85.4**	90.0	88.9
F	-	-	-	-	-	-	82.5	**86.5**	91.8	91.3
G2	-	-	-	-	-	-	-	77.9	80.4	80.0
H	-	-	-	-	-	-	-	-	91.9	91.1
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96.9
J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Adapté de Makrigiannis et Anderson (2000)

Ce tableau indique le pourcentage d'homologie en nucléotides pour les différents gènes *Ly49* (entièrement clonés) de la souris B6. L'identité en nucléotides des récepteurs Ly49E, F et H est plus beaucoup plus forte avec Ly49C (chiffres en gris foncé) qu'avec Ly49A, Ly49B, Ly49D ou Ly49G ce qui justifie leur appartenance au groupe apparenté à Ly49C. Les trois récepteurs d'intérêt ont également une très haute homologie entre eux, tel qu'indiqué par les chiffres en gris pâle.

Figure 3. Réactivité des anticorps dirigés contre des molécules associées au groupe de récepteurs apparentés à Ly49C avant le début du projet.

Pour mieux illustrer la parenté, les récepteurs sont classés selon l'ordre défini dans l'arbre philogénique récemment publié par Takei *et al.*, 2001.

AcMo	Ly49C	J	I	F	H	E	
SW5E6	+	-	+	-	-	-	Brennan *et al.* 1996b
4LO3311	**+**	-	-	-	-	-	Gosselin *et al.* 1997
5GA5	+	?	+	-	-	-	Depatie *et al.* 1999
8H7	-	-	+	-	-	+	McQueen *et al.* 1999
14B11	+	-	+	+	+	-	Corral *et al.* 1999

L'ADNc de Ly49H a été identifié pour la première fois par Wong et collaborateurs à partir d'une banque de poumon provenant de souris hybrides (CBA x B6) F_1 (Wong *et al.*, 1991). Il a ensuite été identifié comme un membre de la famille multigénique Ly49 par la même équipe. À partir d'une banque d'ADN de cellules LAK provenant de souris (C57BL/6 x CBA)F1, ce groupe a en effet isolé par PCR et par criblage l'ADNc de Ly49H (Brennan *et al.*, 1994). Un peu plus tard, un ADNc identique à Ly49H a été cloné par une autre équipe à partir de cellules NK de la souris B6 activées par l'IL-2 (Silver, Elliott et Kane, 1996). Comme pour le récepteur Ly49D, cette étude a rapporté un phénomène d'épissage alternatif au niveau des transcrits du récepteur Ly49H, démontrant la possibilité d'avoir une forme courte ou longue. L'implication de ces deux formes n'est pas très claire mais les auteurs proposent que la séquence de 3 acides aminé (aa) additionnels présente dans la forme longue pourrait servir en tant que site pour des modifications transcriptionnelles. Il est à noter que McQueen et collaborateurs ont eux aussi isolé l'ADNc du récepteur Ly49H chez B6 par "Sourthern Blot" en utilisant une amorce dérivée du gène *Ly49c* (McQueen *et al.*, 1998).

La forte homologie en acides aminés des molécules Ly49 est bien connue. Quand on regarde plus précisément les récepteurs Ly49E, Ly49F et Ly49H dans les portions de la tige et du CRD, les résidus uniques à un récepteur donné et à une position précise sont rares (Tableau II). Cette grande similarité constitue un obstacle sérieux à la production d'anticorps monoclonaux reconnaissant un seul récepteur.

7. Importance relative des populations qui expriment les récepteurs Ly49E, F et H

Plusieurs études ont par la suite tenté de mieux cerner les propriétés de ces récepteurs. Takei *et al.* (2001) ont entrepris d'analyser chez la souris B6, l'expression de tous les gènes Ly49 connus par une méthode de RT-PCR qui permet d'étudier des cellules individuelles. Dans les 80 cellules étudiées, 66 patrons d'expression différents se sont présentés. La plupart des cellules exprimaient au moins un récepteur Ly49. L'ARNm des Ly49E et F n'a pas été détecté une seule fois parmi les 80 cellules, tandis que l'ARNm de Ly49H a été décelé dans 12.5% des cellules (Takei *et al.*, 2001). Dans une étude

Tableau II. Nombre de résidus uniques aux récepteurs concernés à des positions précises de la tige et du CRD par rapport au nombre total de résidus dans chacune des portions du domaine extracellulaire.

Récepteurs	Tige	CRD
Ly49E	3 / 77	7 / 125
Ly49F	4 / 77	7 / 125
Ly49H	4 / 77	4 / 125

Ces données ont été établies sur la base des séquences connues des 10 récepteurs Ly49 clonés chez la souris C57BL/6 (Ly49A à Ly49J).

précédente, les ARNm des récepteurs Ly49E et Ly49F ont toutefois été détectés par hybridation à une sonde spécifique à partir d'un échantillon de 1000 cellules NK. Les auteurs concluent de ces observations que l'absence de détection de cellules NK exprimant les ARNm de ces récepteurs dans les cellules individuelles est probablement due à la faible fréquence de cellules NK exprimant ces gènes (Kubota *et al.*, 1999). Il s'avère alors que les trois récepteurs d'intérêt, mais plus particulièrement les récepteurs Ly49E et Ly49F sont faiblement représentés dans la population. Ceci constitue une difficulté supplémentaire pour poursuivre leur caractérisation.

8. Récepteur Ly49E

Au plan structural, l'ADNc de Ly49E est constitué de 1147 nucléotides et contient des extrémités 5'UT et 3'UT, en plus d'avoir un signal de polyadénylation et une queue poly A. Par ailleurs, un cadre de lecture ouvert codant pour 266 acides aminés et pour un polypeptide de 30 840 Da, a été rapporté. Ce cadre de lecture ouvert contient trois sites potentiels de N-glycosylation dans le domaine extracellulaire. Cette molécule a la particularité de posséder à la fois un motif ITIM et un acide aminé chargé dans le domaine transmembranaire, ce qui fait en sorte que sa fonction pourrait être ambivalente (Smith *et al.*, 1994). Le récepteur Ly49E a tout de même été classé dans la catégorie des récepteurs d'inhibition puisqu'il possède un motif ITIM. La présence de deux structures contradictoires pourrait faire en sorte que l'engagement du récepteur, possiblement via des portions distinctes du domaine extracellulaire, induise des signaux intracellulaires différents.

Étant donné l'absence d'anticorps monoclonal réagissant contre le récepteur Ly49E au début de mon projet de maîtrise, les études antérieures concernant ce récepteur avaient plutôt ciblé la présence d'ARNm dans les cellules NK ou LAK. Une étude réalisée sur des cellules thymiques fœtales de 14 jours, cultivées en présence d'IL-2 a montré que ces cellules étaient considérées fonctionnellement matures tout comme des cellules NK spléniques adultes, mais que les cellules fœtales avaient un répertoire de récepteurs NK différent. En effet, à l'aide des anticorps disponibles, l'expression de

molécules Ly49 n'a pu être détectée sur les cellules thymiques fœtales (Toomey *et al.*, 1998; Manoussaka *et al.*, 1998). Malgré l'absence des molécules Ly49, ces cellules tuent de façon préférentielle les cellules tumorales et blastiques déficientes dans l'expression des molécules de classe I du CMH. Des analyses par RT-PCR ont révélé que même si les cellules thymiques fœtales en culture étaient déficientes dans l'expression d'ARNm des récepteurs Ly49A, B, C, D, G, H et I, elles exprimaient de hauts niveaux d'ARNm pour le récepteur Ly49E. Le niveau d'expression de Ly49E dans les cellules thymiques fœtales en culture et dans les cellules NK spléniques adultes serait comparable mais, chez l'adulte, il représente moins de 1/100 du niveau d'expression des autres Ly49 mentionnés. Ceci laisse croire que le récepteur Ly49E pourrait avoir une fonction importante dans le développement précoce de la lignée NK (Toomey *et al.*, 1998). Un an plus tard, la même équipe a obtenu très peu de transcrits de Ly49E sur des thymocytes frais provenant de souris de 14 jours de gestation alors qu'un fort signal pour ce récepteur a été enregistré sur des cellules thymiques fœtales en culture (Toomey *et al.*, 1999).

Pendant ce temps, un second groupe de recherche s'est intéressé aux cellules thymiques foetales mais cette fois de souris de 17 jours de gestation. Au point de vue phénotypique, la majorité des cellules foetales de 17 jours $NK1.1^{+}CD3^{-}$ du thymus ou de la rate expriment des niveaux similaires de FcγR, IL-2Rβ et 2B4 comparé aux cellules NK spléniques adultes (Van Beneden *et al.*, 1999). Tout comme le phénotype rapporté pour les cellules thymiques foetales de souris de 14 jours de gestation (Toomey *et al.*, 1998; Toomey *et al.*, 1999), l'analyse du répertoire de récepteurs Ly49 des cellules thymiques foetales fraîches de 17 jours a révélé l'absence d'expression des récepteurs Ly49 pour lesquels des anticorps étaient disponibles. Ensuite, par RT-PCR semi-quantitatif, Van Beneden *et al.* ont observé 30 fois plus d'ARNm du récepteur Ly49E dans les thymocytes frais de ces souris que dans des cellules spléniques adultes. Il est important de noter qu'alors que l'équipe de Toomey a détecté très faiblement un signal venant de Ly49E sur des thymocytes fœtaux frais de 14 jours, le signal pour Ly49E est très fort dans les thymocytes frais de 17 jours (Van Beneden *et al.*, 1999). En plus d'observer des transcrits de Ly49E dans des cellules fraîches, Van Beneden et collaborateurs en ont aussi observé dans des thymocytes en culture. D'ailleurs, le niveau

d'ARNm détecté dans les cellules fœtales fraîches est semblable après une culture de 4 jours en présence d'IL-2. Étant donné l'absence de réactifs sérologiques contre Ly49E à cette période, le rôle régulateur de ce récepteur dans l'activité fonctionnelle des cellules thymiques foetales n'a pu être étudié (Van Beneden *et al.*, 1999).

8.1 Cellules fœtales

Puisque les cellules foetales semblent intéressantes pour l'étude du récepteur Ly49E, voyons un peu plus en détail certaines de leurs caractéristiques. Les thymocytes fœtaux seront abordés plus précisément.

Les cellules les plus précoces à coloniser le thymus, les TLP (thymic lymphoid progenitor), sont des précurseurs lymphoïdes capables de donner lieu entre autres aux lignées de cellules B, T et NK. Peu de temps après l'exposition au microenvironnement thymique, ces précurseurs s'engagent vers la lignée T/NK. Subséquemment, une vague de différenciation des thymocytes est établie dans le thymus et elle est marquée par l'apparition ordonnée de stades développementaux variés menant soit aux cellules T ou aux cellules NK (Carlyle *et al.*, 1998). L'engagement du stade fœtal T/NK peut donc être induit par le stroma thymique, ce qui implique que le thymus fœtal est vraiment en mesure de supporter la différenciation des cellules NK (Carlyle *et al.*, 1997; Carlyle *et al.*, 1998). Cependant, il est peu probable que cette série d'événements soient dépendants du thymus puisque les cellules NK ne requièrent pas le thymus pour leur développement (revue par Carlyle et Zuniga-Pflucker, 1998). Il a récemment été démontré que les précurseurs engagés vers la lignée NK et même aussi des cellules NK fonctionnelles se développent *in situ* dans le thymus avant le 15ième jour de gestation (revue par Carlyle et Zuniga-Pflucker, 1998). Ces cellules qui ont le phénotype NK1.1^{+} CD117^{-} expriment les gènes associés aux fonctions effectrices des cellules NK, et montrent une activité cytotoxique non restreinte par le CMH (Carlyle *et al.*, 1998). De manière séquentielle, on détecte dans le thymus l'ARNm du marqueur NK1.1 chez des fœtus de 9 jours (Ballas *et al.*, 1997). La migration des précurseurs hématopoïétiques du foie vers le thymus se fait au 12ième jour de la gestation. Entre les 13 et 14ième jours, il y a émergence des

thymocytes $NK1.1^+$ $CD117^-$. Aux 14 et 15ième jours pour certains (Carlyle *et al.*, 1998) et aux 15 et 16ième jours pour d'autres (Ballas *et al.*, 1997), les cellules $NK1.1^+$ $CD117^-$ prédominent dans le thymus, et il y a une diminution de cette population au 17ième jour (Ballas *et al.*, 1997). Ce pic précède de peu l'apparition des thymocytes $CD4^+CD8^+$ qui sont bien présents au 17ième jour. Les cellules $NK1.1^+$ des 15 et 16ième jours n'expriment pas le CD3ε mais expriment entre autres le marqueur 2B4 et la chaîne β du récepteur pour l'IL-2 (Ballas *et al.*, 1997). Au 17ième jour de gestation, la majorité des cellules $NK1.1^+$ du thymus sont $CD3^-$ (Campbell et Colonna, 2000). Tout comme les splénocytes adultes, les thymocytes fœtaux peuvent proliférer selon des conditions bien particulières de composition en cytokines.

9. Récepteur Ly49F

Au niveau génomique, l'ADNc du Ly49F contient des régions 5'UT et 3'UT, un signal de polyadénylation et une queue poly A. Comme pour Ly49E, l'ADNc de Ly49F contient un cadre de lecture ouvert codant pour un polypeptide de 266 acides aminés, mais le polypeptide a une masse moléculaire de 31 266 Da. De plus, le polypeptide contient deux sites de N-glycosylation dans la région extracellulaire. Comme mentionné précédemment dans le cas de Ly49E, Ly49F possède lui aussi un ITIM et un acide aminé chargé transmembranaire (Smith, Karlhofer et Yokoyama, 1994).

Étonnamment, malgré que le récepteur Ly49F soit un des premiers gènes identifiés, nous connaissons peu de choses concernant sa distribution et ses propriétés physiologiques. Au début du projet, le seul AcMo connu réagissant avec ce récepteur était 14B11 qui se lie à la majorité des cellules NK murines (Corral *et al.*, 1999). En fait, cet anticorps, qui réagit contre les récepteurs Ly49C, I, F et H s'avère peu intéressant pour la caractérisation de Ly49F vu sa réactivité croisée avec d'autres récepteurs, d'où la nécessité de produire un réactif spécifique.

10. Récepteur Ly49H

Sur la base de la séquence en acides aminés, Ly49H présente une forte homologie avec le récepteur Ly49C surtout dans la portion extracellulaire (90%) (Brennan *et al.*, 1994). Par ailleurs, le domaine cytoplasmique des récepteurs Ly49D et Ly49H, même s'ils sont similaires entre eux, diffère des autres membres de la famille Ly49 puisqu'il ne possède pas de résidus tyrosine et par conséquent ces récepteurs ne peuvent assurer seuls la transduction de signaux intracellulaires (Silver *et al.*, 1996). Au sein du groupe de récepteurs apparentés à Ly49C et exprimés chez la souris B6, le récepteur Ly49H est le seul membre possédant des propriétés d'activation.

Le travail sur le récepteur Ly49H s'est poursuivi par l'équipe de Lanier. Ces chercheurs ont réussi à exprimer en surface de cellules transfectées de hauts niveaux de récepteurs Ly49H et Ly49D en association avec DAP12, et ont montré entre autres une association physique de ces deux récepteurs avec la molécule adaptatrice. La stimulation des transfectants avec des anticorps reconnaissants un épitope d'identification ajouté aux récepteurs Ly49D et Ly49H a permis l'activation cellulaire démontrée par l'induction de la phosphorylation sur tyrosine de plusieurs substrats cellulaires (Idris *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998).

Par la suite, Gosselin et collaborateurs ont rapporté d'autres éléments quant à la nature de Ly49H. Un ADNc chimérique contenant les domaines intracellulaire et transmembranaire de Ly49H et le domaine extracellulaire de Ly49A a été généré et cotransfecté avec DAP12 dans des cellules 293T. L'engagement du complexe a conduit à la phosphorylation de DAP12, à la mobilisation du calcium intracellulaire et à la sécrétion de TNF-α (Gosselin *et al.*, 1999). Conformément aux attentes, ces résultats confirmaient la nature activatrice du récepteur.

11. La famille des récepteurs NKG2

Chez la souris, la famille de récepteurs Ly49 a procuré une base moléculaire substantielle pour la détection des molécules de classe I du CMH par les cellules NK (Yokoyama, 1995; Vance et Raulet, 1998), mais il subsiste quelques inconsistances. Par exemple, certaines cellules NK sur lesquelles on ne peut détecter la présence de molécules Ly49, ne lysent pas des cellules cibles tumorales exprimant des molécules de classe I du CMH, mais tuent celles qui n'en expriment pas. C'est ici qu'intervient l'autre famille de récepteurs à laquelle je m'intéresse, soit les récepteurs hétérodimériques CD94/NKG2, également apparentés aux lectines de type-C et exprimés sur les cellules NK. C'est le seul groupe de récepteurs spécifiques des molécules du CMH de classe I qui soit présent autant chez l'humain, que chez le rat et la souris (Vance *et al.*, 1998).

11.1 Une molécule de classe I du CMH non-classique comme ligand des hétérodimères CD94/NKG2

Les récepteurs CD94/NKG2 ont comme ligand une molécule de classe I non-classique du CMH. Cette molécule de classe I non-classique du CMH a, à l'origine, été distinguée des molécules de classe I classique du CMH par son polymorphisme limité. Chez l'humain, il y a plusieurs molécules non-classiques dont HLA-E, le ligand des récepteurs CD94/NKG2. Chez la souris, ces récepteurs ont comme ligand Qa-1^b qui est l'équivalent de la molécule HLA-E humaine (Vance *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998).

11.2 Nécessité du peptide Qdm pour la reconnaissance de Qa-1^b par les récepteurs CD94/NKG2 murins

Chez la souris, la reconnaissance de Qa-1^b nécessite autant CD94 que NKG2 (Vance *et al.*, 1998). Qa-1^b fixe spécifiquement et de façon prédominante un peptide de neuf acides aminés dérivé de la séquence signal des molécules de classe I du CMH, H-2D et H-2L (Aldrich, Rodgers et Rich, 1988). Ce peptide nommé Qdm (Qa-1 determinant modifier) a la séquence AMAPRTLLL (Aldrich *et al.*, 1994). Qdm est clivé par une peptidase signal (enzyme du réticulum endoplasmique), mais il n'est pas présenté par Qa-1^b à moins d'être transporté par TAP, le transporteur associé à la présentation

antigénique (Bai, Broenet et Forman, 1998). Des expériences fonctionnelles ont démontré que les cellules NK ne vont pas reconnaître Qa-1^b à moins que Qdm n'y soit associé (Vance, Jamieson et Raulet, 1999). Donc, la cellule NK est en quelque sorte un outil versatile, puisqu'elle peut surveiller par plusieurs mécanismes l'expression de molécules classe I du CMH sur des cellules cibles (O'Callaghan, 2000).

11.3 Les différentes molécules NKG2

Il existe plusieurs polypeptides NKG2 chez la souris. Au niveau de l'ARNm, on connaît au moins quatre transcrits différents : NKG2A, B, C et E. Deux de ces molécules, soit NKG2C et NKG 2E présentent des caractéristiques des récepteurs d'activation (Ho *et al.*, 1998; Vance, Jamieson et Raulet, 1999) tandis que NKG2A possède des propriétés inhibitrices (Vance *et al.*, 1998). Le transcrit NKG2B provient d'un épissage alternatif de *NKG2a*. Malgré que NKG2B possède un motif ITIM dans son domaine cytoplasmique tout comme NKG2A, une fonction inhibitrice n'a pas été démontrée (Lohwasser *et al.*, 1999). Il est à noter que des études ont rapporté que l'ARNm de NKG2C et NKG2E était considérablement moins abondant que les transcrits de NKG2A dans des cellules NK murines (Kraft *et al.*, 2000; Vance, Jamieson et Raulet, 1999). La fréquence des cellules dans lesquelles des ARNm de NKG2C et NKG2E peuvent être détectés est égale ou inférieure à 10% (Takei *et al.*, 2001). Les polypeptides NKG2 forment des hétérodimères avec la molécule peu polymorphe CD94 (Vance *et al.*, 1997). Cette famille de récepteurs tout comme les récepteurs Ly49 est très homologue du point vue de la séquence en acides aminés. L'homologie dans la tige va de 54 à 80%, tandis qu'elle est de 96 à 99% dans le CRD. Encore une fois, la grande homologie en acides aminés rend difficile la production de réactifs spécifiques et donc la caractérisation des récepteurs de chaque type.

11.3.1 NKG2A

Assez récemment, l'ADNc du polypeptide NKG2A murin a été cloné (Silver, Lau et Kane, 1999; Lohwasser *et al.*, 1999). La transfection dans des cellules COS des ADNc codant pour les deux chaînes de l'hétérodimère CD94/NKG2A de même que l'utilisation

de cellules NK normales a permis de montrer l'interaction des récepteurs avec Qdm fixé à Qa-1^b (Salcedo *et al.*, 1998; Silver, Lau et Kane, 1999). L'interaction entre CD94/NKG2A et Qa-1^b a conduit à l'inhibition de la lyse de cellules sensibles aux cellules NK, démontrant l'importance de NKG2A en tant que régulateur négatif de l'activité fonctionnelle des cellules NK chez la souris (Vance *et al.*, 1998). Notre intérêt marqué pour NKG2A vient du fait que ce membre présente une plus faible homologie en acides aminés au niveau de la tige avec les autres NKG2. Cette caractéristique rend intéressante l'ajout de NKG2A en tant que témoin dans les expériences prévues dans ce mémoire. Une étude du répertoire de récepteurs sur les cellules NK néonatales a démontré le fort pourcentage (60%) de cellules exprimant NKG2A comparé aux récepteurs Ly49 (Kubota *et al.*, 1999). Chez les cellules NK adultes, NKG2A est exprimé à une fréquence d'environ (35%) (Takei *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'hétérodimère CD94/NKG2A est exprimé au niveau fœtal. La majorité des cellules thymiques foetales $NK1.1^+$ $Ly49^-$ expriment ce complexe, ce qui pourrait alors servir à maintenir la tolérance au soi en absence de récepteurs Ly49 (Sivakumar *et al.*, 1999; Salcedo *et al.*, 2000). Toomey et collaborateurs ont même repéré par RT-PCR, sur des thymocytes provenant de souris de 14 jours de gestation, un fort signal pour les transcrits des molécules CD94 et NKG2A, mais un faible signal dans le cas de NKG2C (Toomey *et al.*, 1999).

12. Problématique et objectif du projet

Les récepteurs Ly49 sont très homologues, surtout dans la portion extracellulaire. En plus de présenter une similarité structurale, il y a coexpression de plusieurs récepteurs Ly49 à la fois sur une même cellule. Plusieurs des AcMo produits à ce jour contre ces récepteurs reconnaissent des épitopes communs à plus d'un récepteur. Cet état de fait freine la caractérisation de l'ensemble des membres de la famille Ly49. Le projet visait à produire et éventuellement à caractériser des anticorps monoclonaux contre trois récepteurs du groupe apparenté au récepteur Ly49C, dont le niveau d'homologie dans la séquence nucléotidique varie de 85.4 à 96.9%. Les récepteurs d'intérêt sont Ly49E, Ly49F et Ly49H. Alors que des cellules transfectées avec le récepteur Ly49F adhèrent faiblement à des blastes ConA de souris H-2^d il n'a pas été possible de démontrer la

réactivité de Ly49F avec les tétramères solubles des molécules H-2K^d, H-2D^d ou H-2L^d (Hanke *et al.*, 1999). Par ailleurs, on ne sait rien des ligands de Ly49E et Ly49H.

Au début du projet, un seul anticorps reconnaissant un seul des récepteurs du groupe apparenté à Ly49C était disponible (Figure 3). L'AcMo 4LO3311 qui réagit uniquement avec Ly49C a d'ailleurs été produit par notre laboratoire. Le récepteur Ly49E n'était reconnu par aucun anticorps alors que les récepteurs Ly49F et Ly49H étaient reconnus par 14B11 un anticorps multispécifique. Notre stratégie était d'utiliser une banque de phages recombinants exprimant des séquences cibles des récepteurs d'intérêt pour le criblage des hybridomes. Les récepteurs en cause étant apparemment exprimés sur des populations NK de petites tailles, et afin de valider notre approche expérimentale dans des conditions plus favorables, un autre récepteur a été ajouté à notre analyse soit le récepteur NKG2A qui est exprimé sur 35% des cellules NK. Il n'existe pas non plus d'anticorps qui reconnaissent exclusivement NKG2A.

La production d'un anticorps réagissant avec un seul récepteur permettrait notamment de déterminer la distribution tant cellulaire que tissulaire des récepteurs concernés chez diverses souches de souris, d'étudier leurs propriétés dans un contexte physiologique, et d'analyser la régulation de leur expression.

Méthodologie

I- Préparation des phages recombinants

1. Choix des séquences

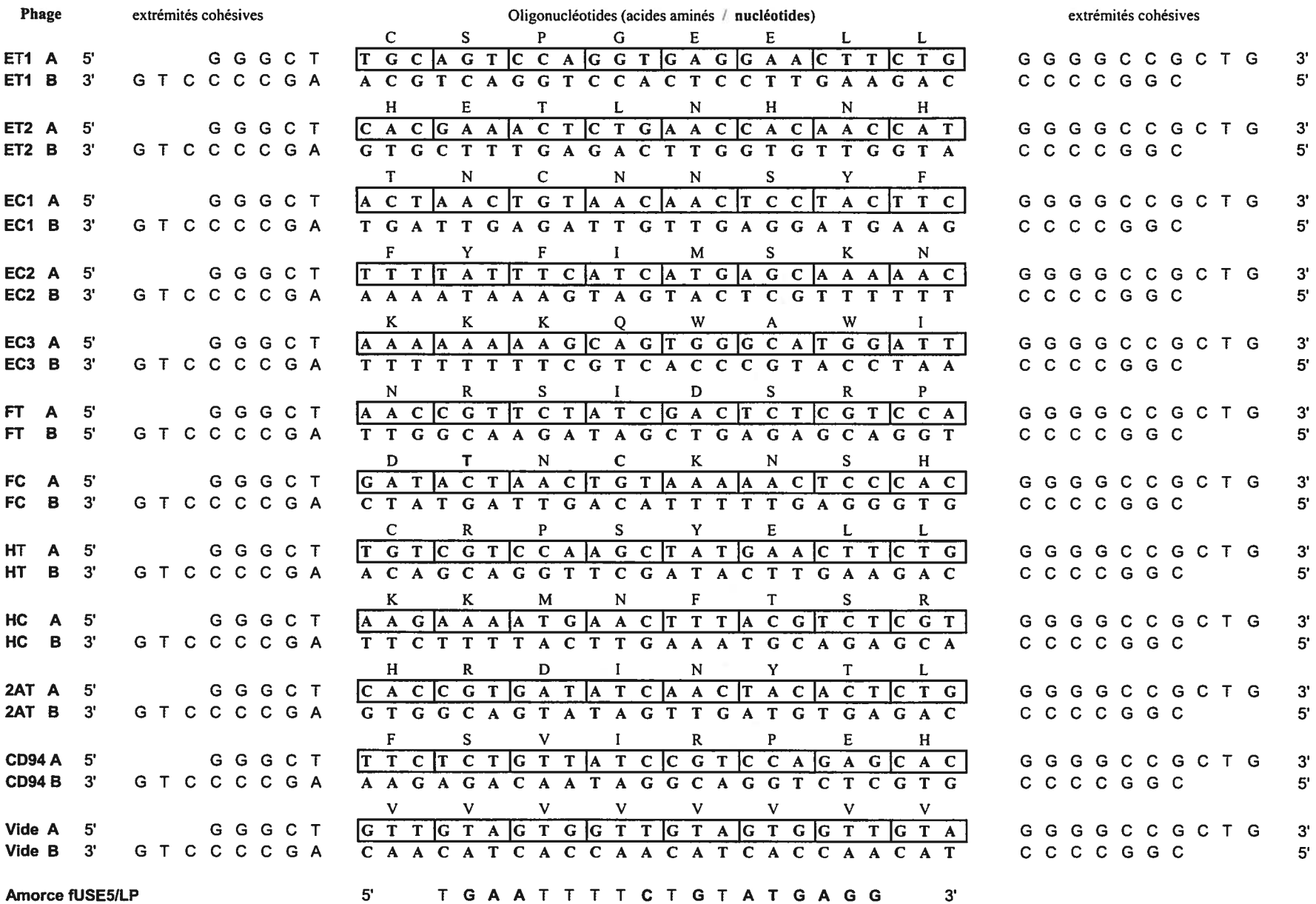
Ayant décidé au début du projet que l'immunisation des animaux (section III) se ferait avec une suspension hétérogène de cellules, nous pouvions espérer que de nombreux Ac soient générés, notamment contre les récepteurs visés. Pour arriver à discriminer les hybridomes produisant les Ac de la spécificité voulue, des phages recombinants ont été utilisés. Ces phages devaient exprimer un épitope précis des récepteurs Ly49 et CD94/NKG2 ciblés. À cet effet, des oligonucléotides ont été sélectionnés dans la portion extracellulaire de chacun des récepteurs. Les séquences sélectionnées ont été insérées dans la protéine pIII du phage filamenteux fUSE5 selon la technologie de Scott et Smith (1990). Les différents codons ont été vérifiés avec le système de traduction chez *E.coli* (Sharp *et al.*, 1988) et des changements ont été apportés le cas échéant afin que les inserts soient correctement traduits.

2. Préparation des oligonucléotides

Les différents oligonucléotides (Figure 4) produits par le service de synthèse d'oligonucléotides du Dr François Shareck du centre de microbiologie et biotechnologie de l'INRS-Institut Armand-Frappier, ont été purifiés par précipitation à l'éthanol en présence de $MgCl_2$. Ensuite, afin d'assurer une liaison adéquate entre les extrémités cohésives des fragments du site de clivage de l'enzyme Sfi1 des oligonucléotides et du vecteur fUSE5, l'extrémité 5' des oligonuclétides de l'insert a été phosphorylée en présence d'ATP 1 mM et 30 U de la kinase T4 (USB, Amersham, Baie d'Urfé, Québec, Canada), 1 h à 37°C. Les oligonucléotides complémentaires ont été appariés dans un rapport 1 pour 1 par chauffage à 90°C pendant 5 min puis en laissant refroidir les milieux réactionnels à la température de la pièce. On se retrouve alors avec des inserts double brins prêts à être insérés dans le vecteur fUSE5. La concentration de chacun des oligonucléotides est présentée au tableau I à l'annexe I.

Figure 4. Séquences des oligonucléotides insérés dans le phage fUSE5

Cette figure illustre les séquences en acides aminés et en nucléotides (lettres en gras) des oligonucléotides complémentaires (brin + : A et brin - : B) insérés dans le phage fUSE5. Ces séquences représentent des régions de huit acides aminés des récepteurs Ly49E (**E**), F (**F**), H (**H**), NKG2A (**2A**) ou **CD94**, situées dans la portion extracellulaire, soit au niveau de la tige (**T**) ou du CRD (**C**). Le phage nommé V est un phage témoin négatif dont la séquence de 8 résidus valine ne s'apparente en aucun point à une séquence connue des récepteurs NK ni à aucune autre séquence présente dans une protéine de souris. Pour permettre la ligation avec le vecteur, des séquences cibles correspondant à des fragments du site de clivage de l'enzyme Sfi1 ont été ajoutés.


Phage
extrémités cohésives
Oligonucléotides (acides aminés / nucléotides)
extrémités cohésives
ET1 A 5' G G G C T
ET1 B 3' G T C C C C G A
C S P G E E L L
T G C A G T C C A G G T G A G G A A C T T C T G
A C G T C A G G T C C A C T C C T T G A A G A C
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
ET2 A 5' G G G C T
ET2 B 3' G T C C C C G A
H E T L N H N H
C A C G A A A C T C T G A A C C A C A A C C A T
G T G C T T T G A G A C T T G G T G T T G G T A
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
EC1 A 5' G G G C T
EC1 B 3' G T C C C C G A
T N C N N S Y F
A C T A A C T G T A A C A A C T C C T A C T T C
T G A T T G A G A T T G T T G A G G A T G A A G
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
EC2 A 5' G G G C T
EC2 B 3' G T C C C C G A
F Y F I M S K N
T T T T A T T T C A T C A T G A G C A A A A A C
A A A A T A A A G T A G T A C T C G T T T T T T
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
EC3 A 5' G G G C T
EC3 B 3' G T C C C C G A
K K K Q W A W I
A A A A A A A A G C A G T G G G C A T G G A T T
T T T T T T T T C G T C A C C C G T A C C T A A
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
FT A 5' G G G C T
FT B 5' G T C C C C G A
N R S I D S R P
A A C C G T T C T A T C G A C T C T C G T C C A
T T G G C A A G A T A G C T G A G A G C A G G T
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
FC A 5' G G G C T
FC B 3' G T C C C C G A
D T N C K N S H
G A T A C T A A C T G T A A A A A C T C C C A C
C T A T G A T T G A C A T T T T T G A G G G T G
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
HT A 5' G G G C T
HT B 3' G T C C C C G A
C R P S Y E L L
T G T C G T C C A A G C T A T G A A C T T C T G
A C A G C A G G T T C G A T A C T T G A A G A C
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
HC A 5' G G G C T
HC B 3' G T C C C C G A
K K M N F T S R
A A G A A A A T G A A C T T T A C G T C T C G T
T T C T T T T A C T T G A A A T G C A G A G C A
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
2AT A 5' G G G C T
2AT B 3' G T C C C C G A
H R D I N Y T L
C A C C G T G A T A T C A A C T A C A C T C T G
G T G G C A G T A T A G T T G A T G T G A G A C
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
CD94 A 5' G G G C T
CD94 B 3' G T C C C C G A
F S V I R P E H
T T C T C T G T T A T C C G T C C A G A G C A C
A A G A G A C A A T A G G C A G G T C T C G T G
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
Vide A 5' G G G C T
Vide B 3' G T C C C C G A
V V V V V V V V
G T T G T A G T G G T T G T A G T G G T T G T A
C A A C A T C A C C A A C A T C A C C A A C A T
G G G G C C G C T G 3'
C C C C G G C 5'
Amorce fUSE5/LP
5' T G A A T T T T C T G T A T G A G G 3'

3. Préparation du vecteur fUSE5

Le vecteur fUSE5 nous a été donné par le Dr Rosemonde Mandeville (Biophage Inc, Montréal, Québec) avec l'accord du Dr Smith de l'université du Missouri (Tableau III). Le vecteur fUSE5, sous sa forme réplicative, possède deux sites de restriction Sfi1 séparés par 14 paires de bases ce qui lui permet de recevoir des inserts au niveau du gène pIII de son génome.

L'amplification et la purification du vecteur fUSE5 ("low copy") ont été faites avec la trousse QIAGEN "Plasmid Maxi Kit" (Mississauga, Ontario, Canada). Le clivage du vecteur sous sa forme réplicative (FR) a été effectué sur 100 µg de vecteur en ajoutant 300 unités d'enzyme Sfi1. L'efficacité du clivage a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 0,8%/TAE (40 mM Tris-acétate pH 7,8, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA), d'un échantillon du produit de la réaction de clivage. Le vecteur clivé a ensuite été purifié par une extraction au phénol/chloroforme deux fois consécutives, suivi d'une précipitation à l'éthanol.

La réaction de ligation entre les oligonucléotides et le vecteur purifié, mélangé dans un rapport 2 pour 1, a été effectuée en ajoutant 1027 unités par millilitre de ligase T4 (USB, Amersham Life Science) et de l'ATP 1 mM, et en incubant le mélange une nuit à 14°C. Le produit de la réaction de ligation a subi ensuite une étape de précipitation à l'éthanol afin d'éliminer toutes traces de sels qui sont nuisibles lors de l'électroporation. Afin de s'assurer de l'efficacité de ligation, un échantillon du produit de la ligation a été déposé dans un gel d'agarose 0,8%/TAE en parallèle avec le vecteur non-clivé et linéarisé (fUSE5/Sfi1). Suite à la migration par électrophorèse, l'efficacité de la réaction est confirmée par la présence d'une bande d'ADN circulaire qui migre plus lentement. Deux témoins ont été ajoutés : le vecteur non clivé (RF), qui donne trois bandes d'ADN (ADN circulaire, ADN linéaire et la forme superenroulée d'ADN) et le vecteur clivé fUSE5/Sfi I, ce qui correspond en fait à la forme linéaire du vecteur.

Tableau III. Caractéristiques des constituants utilisés pour la production des phages recombinants

Vecteur	Propriétés
fUSE5 (9252pb)	Vecteur d'ADN double brin dérivé de la forme réplicative (FR) du bactériophage filamenteux fd. Ce vecteur, développé dans le laboratoire de G. P. Smith (Parmley et Smith, 1988), porte un gène de résistance à la tétracycline. Il a été utilisé pour la préparation de phages recombinants dans lesquels un l'épitope des récepteurs Ly49 ou CD94/NKG2 a été cloné dans la protéine pIII. L'infectivité du bactériophage requiert la présence d'un insert dans le gène pIII.
Amorce fUSE5/LP	5' T G A A T T T T C T G T A T G A G G 3'

Souches	Sexe	Génotype	Commentaires
MC1061	F^-	araD139 (ara-leu)7697 (lac)χ74, galU, galK, hsdR2, strA, mcrA, mcrB1	Souche hôte pour l'électroporation Résistante à l'infection Résistante à la streptomycine
K91	Hfr-cavalli	thi-1, Kan^r	Souche utilisée pour l'amplification des banques de phages Sensible à l'infection Résistante à la kanamycine

4. Électroporation

Les vecteurs recombinants ont ensuite été introduits par électroporation à l'intérieur des bactéries électrocompétentes MC1061 (BioRad, Mississauga, Ontario, Canada). Ces bactéries possèdent un gène de résistance à la streptomycine (Tableau III). Puisque le vecteur fUSE5 possède un gène de résistance à la tétracycline, les bactéries MC1061 qui auront incorporé le vecteur pourront être sélectionnées sur un milieu LB 1,5% agar (Annexe I) contenant 40 µg/ml de tétracycline et 100 µg/ml de streptomycine.

Des cuvettes à électroporation stériles de 0,1 cm (BioRad) ont été refroidies dans la glace. Pendant ce temps, l'électroporateur a été ajusté à 1,8 kV, 25 µF et 200 ohms. De 2 à 10 µl du produit de la ligation a été déposé dans une cuvette à électroporation avec 60 µl de cellules MC1061 décongelées extemporanément et le mélange a été mis 30 secondes sur de la glace. Après la décharge électrique, les bactéries électroporées ont été incubées dans 2 ml de milieu SOC (Annexe I) à 37°C pendant 60 min sous agitation légère. Suite à l'incubation, un échantillon a été prélevé et étalé sur des pétris d'agar contenant de la tétracycline et de la streptomycine et incubé 18 h à 37°C. Pour vérifier que l'électroporation n'a pas abîmé les bactéries, un pétri d'agar contenant seulement de la streptomycine a été ensemencé. Des colonies ont été obtenues pour toutes les constructions.

5. Test d'infectivité

Avant de procéder à la vérification de l'intégrité des insertions (par la méthode de séquençage), il est nécessaire de vérifier l'intégrité de la protéine pIII en mesurant l'infectivité des phages. Les bactéries K91 qui ont un gène de résistance à la kanamycine sont sensibles à l'infection par les phages. Leur génotype est décrit dans le tableau III. Pour assurer leur croissance, un échantillon de bactéries a été ensemencé dans 2 ml de milieu LB contenant de la kanamycine (100 µg/ml) et a été incubé une nuit à 37°C sous agitation. Les bactéries ont ensuite été incubées dans 20 ml de milieu LB à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique d'environ 0,45 à 600 nm, ce qui permet d'amplifier les

bactéries pouvant être infectées. Les bactéries ont subi ensuite un jeûne d'antibiotique afin de les rendre plus avides lors du contact avec les phages recombinants. À cet effet, elles ont été resuspendues dans 20 ml de NaCl 80 mM par inversion et ont été agitées à 37°C pendant 45 min. Après centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de NaP froid (Annexe I). Les bactéries peuvent être conservées à 4°C pendant 5 jours. Pour contrôler la résistance sélective des bactéries K91 à la kanamycine et non à la tétracycline, un pétri d'agar LB additionné 100 µg de kanamycine et un second additionné de kanamycine (100 µg) et de tétracycline (40 µg) ont été ensemencés. Le pétri contenant seulement la kanamycine devrait être couvert d'un tapis de colonies tandis que le pétri ayant les deux antibiotiques ne devrait avoir aucune colonie.

Une fois cette vérification complétée, quelques demi-colonies de bactéries MC1061 transformées ont alors été repiquées dans du milieu LB, puis mises en présence des bactéries K91 affamées. Un ml de LB avec de la tétracycline (0,2 µg/ml) est ensuite ajouté à la suspension et incubé à 37°C pendant 30 min sous agitation. Il y a finalement vérification de l'infection en ensemençant l'échantillon à différentes dilutions sur pétri d'agar 1,5% contenant de la kanamycine (100 µg/ml) et de la tétracycline (40 µg/ml). L'intégrité de la protéine pIII a été maintenue pour chacun des vecteurs recombinants puisque plusieurs colonies ont été obtenues dans chaque cas.

6. Séquençage

Une fois que l'intégrité de la protéine pIII des phages recombinants est confirmée par l'infection des bactéries K91, on procède à la vérification de l'intégrité de l'insert par séquençage. Pour ce faire, les mêmes demi-colonies de bactéries MC1061 piquées pour le test d'infectivité, ont été repiquées et déposées dans 1,5 ml de milieu LB contenant 20 µg/ml de tétracycline pour la nuit à 37°C sous agitation. Ensuite, les bactéries ont été récupérées après une centrifugation de 10 min à 15 000 x *g*. À 1 ml de surnageant, 0,25 volume de PEG/NaCl a été ajouté pour précipiter les phages et le tout est incubé 1 h à 4°C. Le culot obtenu a été suspendu dans 100 µl de tampon TE (Annexe I). L'ADN a été isolé par une précipitation au phénol/chloroforme. La phase aqueuse, contenant l'ADN, a

été transférée dans un second tube. On y ajoute ensuite 0,1 volume de NaOAc 3M et 2 volumes d'éthanol 100% et on incube le mélange durant 1h à -20°C. Une centrifugation a permis de récupérer l'ADN dans le culot qui a finalement été dissous dans 10 µl d'eau distillée. Le séquençage a été effectuée à l'aide de l'appareil ABI310 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) par le service de séquençage du laboratoire du Dr Peter Tijssen (INRS-Institut Armand-Frappier) en utilisant l'amorce fUSE5/LP (Figure 4). Pour tous les phages, la séquence s'est avérée exacte.

7. Amplification des phages recombinants

Lorsque l'intégrité de l'insert est confirmée par le séquençage, les phages recombinants peuvent être amplifiés. Des colonies provenant de bactéries K91 transformées ont été piquées et utilisées pour ensemencer 1 ml de milieu LB additionné de tétracycline (0,2 µg/ml). Après 6 h sous agitation, chaque culture a ensuite été versée dans 400 ml ou 800 ml de milieu LB additionné de tétracycline (20 µg/ml) et de kanamycine (50 µg/ml) et ces cultures ont été incubées toute la nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, les phages ont été récupérés dans le surnageant suite à une double centrifugation de 10 min d'abord à 4 500 x *g* puis à 17 500 x *g*. Les phages ont ensuite été précipités en ajoutant 0,15 volume de PEG/NaCl (Annexe I) et les tubes ont été mélangés par inversion avant d'être incubés une nuit à 4°C. Suite à une centrifugation de 40 minutes à 11 000 x *g*, le culot a été repris dans 5 ml de tampon TBS pH 7,5 et a été incubé 30 min à la température de la pièce. À cette étape, un échantillon a été prélevé en vue d'une dernière vérification de l'intégrité de l'insert par séquençage. Les phages ont à nouveau été précipités de la même manière que précédemment. Cette fois le culot a été dissous dans du NaCl 0,15 M et de l'acide acétique 1 M. Après centrifugation à 15 000 x *g* pendant 30 min à 4°C, les phages ont été repris dans 1 ml de TBS-Azide 0,02% et incubés à 4°C pendant 1 h. La concentration en phages par millilitre a été estimée par une lecture au spectrophotomètre à 269 et 320 nm selon la formule suivante : (A269 –A320) (6×10^{16}) / 9200 = phages/ml. La concentration a été ajustée à 5×10^{12} phages/ml (Tableau II, Annexe I).

II- Préparation des cellules pour l'immunisation

1. Enrichissement des cellules NK murines

L'enrichissement des cellules NK a été fait selon la méthode décrite par Morelli *et al.* (1993). Des souris C57BL/6 femelles ou mâles d'au moins 6 semaines (Charles River Inc, St-Constant, Canada) ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Le milieu utilisé est le RPMI 1640 contenant 25 mM d'acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N-2-éthanesulfonique (HEPES), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine nommé RPMI complet (RPMIc). Tous les constituants viennent de chez Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada. Les rates ont été prélevées stérilement et triturées dans du RPMIc puis la suspension a été filtrée sur un coussinet de laine de nylon pour éliminer les agrégats. Les globules rouges ont ensuite été éliminés par lyse osmotique. La suspension cellulaire a été passée sur une colonne de laine de nylon (Fisher, New Jersey, USA) à deux reprises pour éliminer les lymphocytes B et les macrophages. L'éluat de la laine de nylon a ensuite été incubé avec un anticorps de rat anti-CD4 (clone MT4 gracieusement fournis par le Dr Édouard Potworowski, INRS-IAF) pendant 30 min à 4°C. Deux autres anticorps, soit l'anticorps de rat anti-CD8 (clone TIB105 de l'ATCC) et l'anticorps de rat anti-CD24 (clone M1/69 de l'Americain Type Culture Collection, Rockville, MD) ont été ajoutés aux cellules et l'incubation s'est poursuivie pour 30 min sur glace. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du RPMIc, puis incubées avec des billes magnétiques enrobées d'anticorps de chèvre anti-Ig de rat (Dynal Inc., Great Neck, NY, USA) pendant 30 min à 4°C dans un rapport de 5 billes par cellule. Un appareil magnétique (Dynal Inc.) a permis de retenir les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et les polynucléaires $CD24^+$ alors que les cellules NK, non couplées aux billes magnétiques, ont été récoltées dans du milieu RPMIc. Ces cellules ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans 1 ml de milieu complet avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF) pour faire un compte cellulaire. Suite au compte, le volume a été ajusté en fonction de l'utilisation ultérieure des cellules. Cette méthode d'enrichissement permet de récupérer entre 2 et 5% des splénocytes totaux dont la majorité sont des cellules NK. La suspension contient également des cellules NKT $CD4^-CD8^-$.

2. Production des cellules LAK (lymphokine-activated killer)

Afin d'obtenir une plus grande quantité de cellules pour l'immunisation, les cellules NK enrichies ont été mises en culture à raison de 1 x 10^6 cellules/ml dans du milieu RPMIc/10%SVF additionné de β-2-mercaptoéthanol 50 mM (Sigma Chemical, St-Louis, Missouri, USA) et de 300 à 500 U/ml d'interleukine-2 recombinante murine (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada). La culture s'est poursuivie jusqu'à l'obtention du nombre de cellules requises pour l'immunisation (4 à 9 jours). Après avoir prélevé les cellules non-adhérentes, les cellules adhérentes ont été récupérées en ajoutant quelques millilitres d'une solution de PBS (Gibco BRL) contenant 0,1% d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA; Sigma). Les deux suspensions cellulaires ont été combinées, lavées une fois dans du PBS, et la concentration cellulaire de la suspension de cellules LAK a été ajustée selon les besoins.

3. Thymocytes fœtaux

3.1 Accouplement

De 10 à 15 femelles d'élevage C57BL/6 (gracieusement fournies par le Dr Yves St-Pierre) ont été accouplées avec 4 à 5 mâles d'élevage de même souche. Pour obtenir des femelles gestantes à un jour précis, les souris femelles ont été gardées en présence des mâles pendant 16 h. La journée suivante, où la présence d'un bouchon vaginal identifie les femelles gestantes, a été considérée comme le jour 0 de gestation.

3.2 Isolement des thymocytes fœtaux

Les femelles gestantes de 14 ou 17 jours ont été sacrifiées par asphyxie au gaz carbonique et les fœtus ont été prélevés et déposés dans un pétri stérile sans milieu conservé sur glace. Les 2 lobes thymiques de chaque fœtus ont été prélevés sous un microscope à dissection, dans du milieu DMEMc contenant 5 mM d'HEPES, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 50 mM de β-2-mercaptoéthanol (tous de chez Gibco BRL) mais sans SVF pour éviter la formation de mousse. Les lobes ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un « potter ». L'homogénat a été transféré dans un

tube conique contenant du milieu DMEMc et 10% de SVF. Les cellules ont ensuite été centrifugées 5 min à 1000 x *g* et le culot resuspendu dans 1 ml de milieu complet avec sérum. Suite au compte cellulaire, la suspension a été ajustée à 1 ou 2 millions de cellules par millilitre. L'interleukine-2 recombinante murine (rmIL-2) (Boehringer Mannheim) utilisée à 1000 U/ml, l'IL-4 recombinante murine (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) utilisée à 10 U/ml et l'ester de phorbol PMA (phorbol myristate acetate) (Sigma) utilisé à 10 ηg/ml ont été rajoutés au milieu de culture soit séparément ou en combinaison et les cellules ont été placées pour 7 à 8 jours dans un incubateur à 37°C à 5% de CO_2.

4. Analyse par cytométrie en flux

Des échantillons de 3 x 10^5 cellules NK, LAK ou de thymocytes fœtaux frais ou en culture ont été lavés deux fois dans du PBS sans calcium ni magnésium et contenant 1% de SVF et 0,2% d'azide de sodium (PBSc). Les récepteurs Fc ont été bloqués en incubant les cellules avec l'anticorps de rat anti-FcγRII/FcγRIII (clone 2.4G2 de l'ATCC) pendant 20 min à la température de la pièce. Des anticorps, couplés soit à la biotine ou à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), dirigés contre les récepteurs ciblés ont ensuite été ajoutés et les échantillons ont été incubés sur glace pendant 30 min. Le marquage des échantillons incubés avec des anticorps couplés à la biotine est révélé avec un conjugué streptavidine-phycoérythrine (Becton Dickinson, Missisauga, Ontario, Canada) ou streptavidine Red 670 (Gibco BRL) lors des doubles marquages. En dernière étape, les cellules marquées ont été lavées 2 fois dans du PBSc et resuspendues dans la paraformaldéhyde 1% (Gibco BRL). Les échantillons marqués ont été analysés à l'aide du cytofluoromètre Coulter Epics XL-MCL (Beckman Instrument Inc., Mississauga, Ontario, Canada) muni d'un laser Argon de 15 MW qui émet à une longueur d'onde de 488 nm. L'analyse a été effectuée sur une zone d'intérêt qui correspond à une population précise de lymphocytes déterminée par les paramètres de taille et de granularité. Les mesures correspondent à l'analyse de 10 000 événements par échantillon.

III- Immunisation-Fusion

1. Protocoles d'immunisation

Lorsque le nombre voulu de cellules est atteint, ces dernières sont récoltées selon la méthode décrite précédemment. Quatre lavages dans du PBS ont été effectués afin d'éliminer toute trace de sérum dans le milieu. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 1 ml de PBS et la concentration a été ajustée selon les besoins. Deux types de rats ont été utilisés soit les rats Fisher et DA (Charles River Canada Inc.). Les rats Fisher semblaient intéressants car de nombreux AcMo ont été produits en immunisant ce type de rat. Ces rats expriment 3 récepteurs Ly49. Cependant, les rats DA avaient comme avantage de ne pas exprimer de récepteurs Ly49 (Dissen *et al.*, 1996). Toutefois, leur efficacité dans la production d'AcMo est peu documentée. Les animaux, âgés d'au moins 57 jours à la première immunisation, ont été injectés soit par voie sous-cutanée ou par voie intrapéritonéale. Juste avant la première immunisation, dix jours après chaque immunisation subséquente et au moment de la fusion une saignée à l'œil a été pratiquée. Les sérums obtenus ont été utilisés pour la détection d'Ac par le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ainsi que pour la détection d'une réactivité avec des cellules LAK en cytométrie. Les protocoles d'immunisation que nous avons utilisés pour chaque rat sont décrits dans les tableaux IV à VI.

Ainsi, trois rats Fisher ont reçu de 3 à 5 immunisations avec des cellules LAK (Tableau IV). Les doses ont varié entre 6 et 27 millions de cellules tandis que les voies d'injection ont été soit sous-cutanée soit intrapéritonéale. Un second groupe de rats, immunisés d'abord 2 ou 3 fois avec des cellules LAK, ont reçu une à trois injections de rappel en utilisant des phages recombinants comme immunogène (Tableau V). Un de ces rats a reçu par voie intrapéritonéale, un mélange de phages en suspension dans du TBS-Azide 0,02%, contenant des phages recombinants exprimant 7 séquences cibles de différents récepteurs Ly49 et CD94/NKG2. Un autre rat, d'abord immunisé avec des cellules LAK a reçu une injection de rappel avec le phage contenant la séquence cible du récepteur NKG2A. Un dernier rat pré-immunisé avec des cellules LAK a reçu trois injections de rappel par voie intramusculaire avec le phage recombinant exprimant la

Tableau IV. Calendrier d'immunisation de rats Fisher (F) avec des cellules LAK pour la production d'anticorps anti-Ly49 et CD94/NKG2.

Rats	Immunisation	Date	Immunogène	Voie d'inoculation
F0	1ière immunisation	04/08/99	8,3 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	1er rappel	22/09/99	6 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	2ième rappel	02/12/99	6,5 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	3ième rappel	18/01/00	27 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	4ième rappel	28/02/00	10 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	Fusion	02/03/00		
F2	1ière immunisation	16/02/00	12,5 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	1er rappel	20/04/00	7,5 x 10^6 cellules LAK	intrapéritonéale
	3ième rappel	17/05/00	15 x 10^6 cellules LAK	intrapéritonéale
	Fusion	20/05/00		
F1	1ière immunisation	16/02/00	12,5 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	1er rappel	20/04/00	10 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	2ième rappel	17/05/00	10 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	3ième rappel	17/07/00	20 x 10^6 cellules LAK	intrapéritonéale
	Fusion	20/07/00		

Tableau V. Calendrier d'immunisation de rats Fisher (F) et DA avec des cellules LAK et des phages pour la production d'anticorps anti-Ly49 et CD94/NKG2.

Rats	Immunisation	Date	Immunogène	Voie d'inoculation
DA-3	1ière immunisation	16/02/00	12,5 x 10^6 cellules LAK	sous-cutanée
	1er rappel	20/03/00	7,5 x 10^6 cellules LAK	intrapéritonéale
	2ième rappel	17/04/00	10 x 10^6 cellules LAK	intrapéritonéale
	3ième rappel	15/09/00	1 x 10^{12} phages du pool I : ET, EC, FT, FC, HT, HC et 2AT (sans adjuvant)	intrapéritonéale
	Fusion	18/09/00		
F5	1ière immunisation	09/11/00	11,6 x 10^6 cellules LAK	intrapéritonéale
	1er rappel	05/12/00	1 x 10^{12} phages 2AT	intrapéritonéale
	Fusion	08/12/00		
F4	1ière immunisation	09/11/00	11,6 x 10^6 cellules LAK	intrapéritonéale
	1er rappel	21/12/00	15,2 x 10^6 cellules LAK	intrapéritonéale
	2ième rappel	10/04/01	5,2 x 10^{10} phages 2AT avec adjuvant TiterMaxGold	intramusculaire (2 quadriceps)
	3ième rappel	30/04/01	4,6 x 10^{10} phages 2AT avec adjuvant TiterMaxGold	intramusculaire (2 quadriceps)
	4ième rappel	22/05/01	5 x 10^{10} phages 2AT	intrapéritonéale
	Fusion	25/05/01		

Tableau VI. Calendrier d'immunisation de rats Fisher (F) avec des thymocytes fœtaux pour la production d'anticorps anti-Ly49 et CD94/NKG2.

Rats	Immunisation	Date	Immunogène	Voie d'injection
F7	1ière immunisation	02/03/01	13 x 10^6 cellules thymiques fœtales 7j. en culture	intrapéritonéale
	1er rappel	24/04/01	14,2 x 10^6 cellules thymiques fœtales 7j. en culture	intrapéritonéale
	Fusion	27/04/01		
F6	1ière immunisation	24/04/01	14,2 x 10^6 cellules fœtales thymiques 7j. en culture	intrapéritonéale
	1er rappel	23/07/01	18 x 10^6 cellules fœtales thymiques 6 j. en culture	intrapéritonéale
	Fusion	26/07/01		

séquence cible du récepteur NKG2A mélangé à un volume égal d'adjuvant TiterMaxGold. Finalement, dans le tableau VI on retrouve le calendrier d'immunisation des animaux qui ont été inoculés avec des cellules thymiques fœtales de 17 jours cultivées en présence d'IL-2. Les deux rats ont reçu au total 2 immunisations intrapéritonéales.

2. Fusion

Les fusions, pour la production d'hétérohybridomes, ont été faites selon les recommandations du Current Protocols in Immunology (CPI, p.2.5.1-2.5.17). Tous les milieux ont été gardés à 37°C au cours de la fusion. Trois jours après le dernier rappel, la rate du rat est prélevée et triturée dans du milieu DMEMc (Annexe I) puis les cellules sont lavées dans le même milieu. Les partenaires de fusion utilisés ont été soit les cellules sp2-0/Ag14 obtenues du Dr Serge Dea soit les cellules P3X63Ag8.653 (obtenues du Dr Pierre Talbot). Ces deux types de myélomes proviennent de la souris BALB/c et ont la propriété de ne pas sécréter d'Ig. Ils sont par ailleurs sensibles au HAT. Les cellules myélomateuses, en phase exponentielle, ont été prélevées et lavées de la même façon que les cellules spléniques. Suite au compte cellulaire, les volumes respectifs de cellules myélomateuses et spléniques ont été mis ensemble. Les volumes ont été calculés en tenant compte du ratio 10 cellules spléniques pour 1 cellule myélomateuse et selon la concentration des cellules désirée pour la préparation des plateaux de 96 puits (1 à 2.5 x 10^6 cellules/ml). Le mélange a été centrifugé et le PEG 3000 50% a été ajouté au culot suivi du DMEMc. Après une centrifugation, les cellules sont reprises dans la quantité de DMEMc H/P/20% SVF (Annexe I) nécessaire pour le nombre de plateaux à préparer. Les cellules ont été distribuées dans des plaques de 96 puits (Costar, Fisher). Les plaques ont été incubées à 37°C dans une étuve contenant 5% de CO_2. Le lendemain, du milieu DMEMc H/P/20% SVF additionné de HAT 1X (Sigma) a été ajouté aux puits. Aux jours appropriés, le milieu a été remplacé par du milieu frais. Au bout de 11 à 14 jours, le milieu est changé pour du DMEMc H/P/20%SVF additionné de HT 1X (Sigma). Le lendemain ou surlendemain, le milieu est rechangé pour du DMEMc H/P/20%SVF qui servira pour le maintien des hybridomes et éventuellement pour le clonage. Lorsque les hybridomes atteignent une croissance supérieure à 25%, le surnageant de ces puits est

analysé par un test ELISA. Les puits ayant une confluence de plus de 80% sont transférés dans les puits d'une plaque de 24 puits (Costar, Fisher). Les premiers tests visent à identifier les hybridomes sécréteurs d'Ac. Les tests subséquents visent plutôt à identifier les puits sécréteurs d'Ac ayant une spécificité pour un phage ou un groupe de phages.

3. Test ELISA

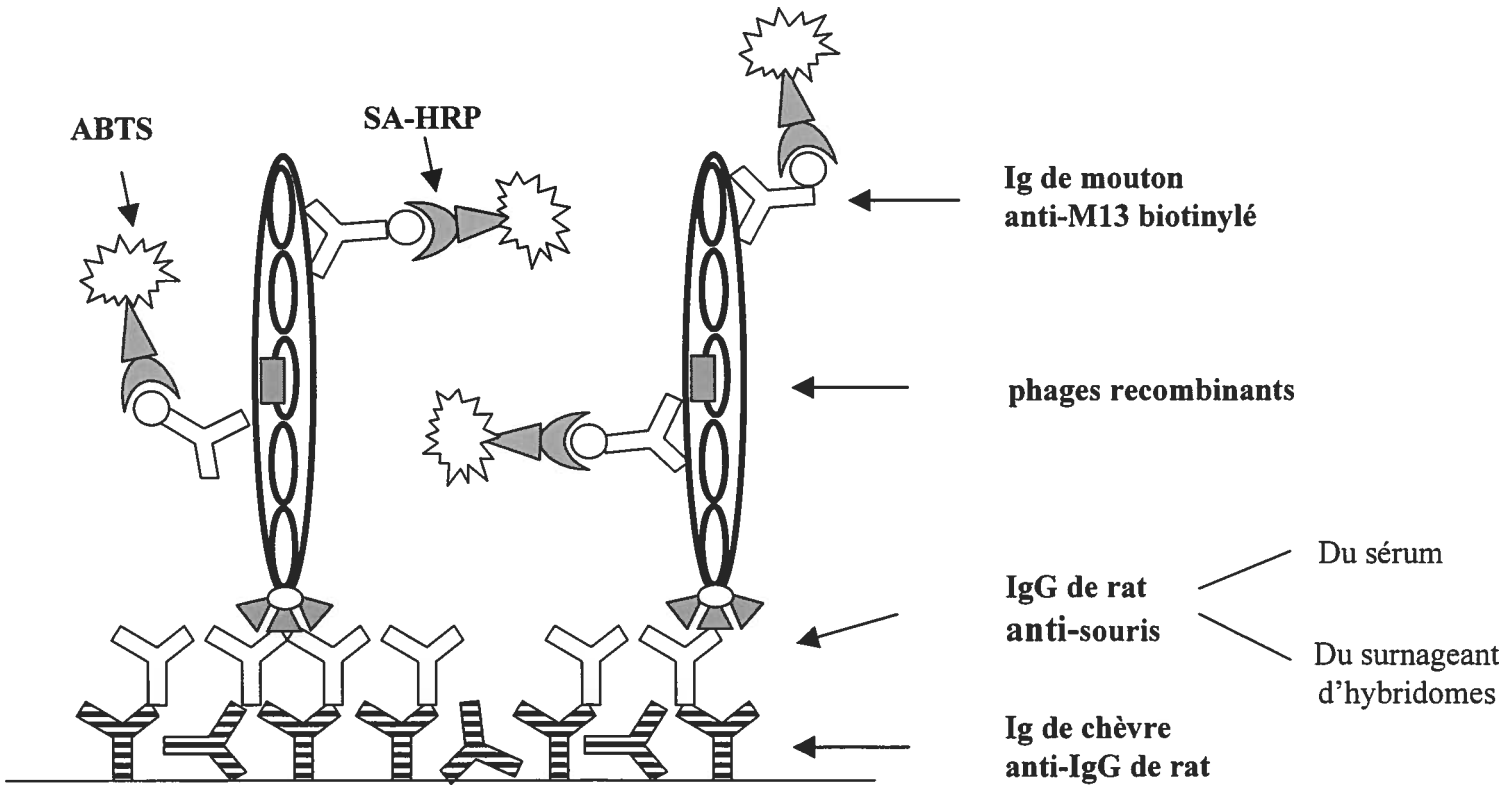
Les étapes du test ELISA utilisé pour la détection d'hybridomes sécréteurs d'anticorps anti-Ly49 ou anti-CD94/NKG2 sont illustrées à la figure 5. Dans un premier temps, un anticorps de chèvre anti-Ig de rat spécifique de la portion Fc des IgG (Jackson Immunoreseach, Bio/Can Scientific, Mississauga, Ontario, Canada) est ajouté dans le fond des puits d'une plaque 96 puits (maxi-sorp Nunc, Fisher). Après une incubation à 4°C de 12 à 96 h, les puits sont lavés avec du PBS-Tween 80 0,002% (solution de lavage). Les parois et le fond des puits sont ensuite bloquées avec du PBS contenant 5% de lait écrémé. À l'étape suivante, 100 µl de surnageant d'hybridomes ou de sérum dilué dans du TBS-Azide 0,02% sont ajoutés. On procède ensuite à l'ajout des phages recombinants, dans un volume final de 10 µl de TBS-Azide 0,02%. L'établissement des conditions optimales est décrit à la section 3 du chapitre Résultats. Le lendemain, les puits ont été lavés avec la solution de lavage. Dans les puits dans lesquels des phages ont été ajoutés, l'anticorps de chèvre anti-M13 biotinylé (5 prime 3 prime Inc., Boulter, Colorado, USA) est ajouté dans la solution de lavage. Cet anticorps reconnaît une protéine de la capside du phage. Cependant, les autres puits reçoivent l'anti-immunoglobuline de rat IgG biotinylé spécifique pour les chaînes lourdes et légères (Jackson Immunoresearch) à une dilution de 1/50 000. Les plaques sont ensuite lavées 5 fois avec la solution de lavage puis le conjugué streptavidine-peroxydase (SA-HRP) (Amersham), dilué dans le tampon de lavage est ajoutée à tous les puits. Suite aux lavages, l'ABTS (Roche Diagnostique, Laval, Québec, Canada) dilué dans du tampon citrate/phosphate contenant 0,03% de peroxyde (H_2O_2), est ajouté à tous les puits et la réaction se poursuit à la température de la pièce. Après une heure, l'intensité de la coloration verte, qui révèle soit la présence d'anticorps, soit la spécificité de l'association entre les phages et les anticorps du surnageant d'hybridome ou du sérum, est mesurée par la densité optique à 405 nm à l'aide d'un

lecteur ELISA (Bio-Tek Instrument autoreader EL309, Mandel Scientific company Ldt). Chacun des tests incluait des témoins négatifs et positifs. Dans le cas d'un test sur un sérum, le témoin négatif était du tampon de dilution. Dans le cas d'un test sur des surnageants d'hybridomes, le milieu de culture de maintien a servi de témoin négatif. Un sérum dont la réactivité avec les groupes de phages recombinants a été préalablement établie a été utilisé en tant que témoin positif.

Il est à noter que la mise au point de ce test a été faite avec un anticorps de souris BCDF9 (F9) dont on connaissait la réactivité avec le phage M1 portant l'épitope GRRPGGWWMR (Popkov *et al.*, 2000).

Figure 5. Représentation schématique des diverses étapes du test de criblage par ELISA

Un anticorps de chèvre anti-IgG de rat est d'abord déposé au fond des puits. Les anticorps (IgG) de rat anti-souris provenant soit du sérum soit du surnageant des hybridomes sont ensuite ajoutés en combinaison avec les phages recombinants. Par la suite, une Ig de mouton biotinylé reconnaissant la protéine M13 des phages est ajoutée aux puits. La streptavidine-peroxydase (SA-HRP) va ensuite se fixer aux molécules de biotine et la révélation se fait en ajoutant le substrat de l'enzyme, c'est-à-dire l'ABTS.


ABTS
SA-HRP
Ig de mouton
anti-M13 biotinylé
phages recombinants
IgG de rat
anti-souris
Du sérum
Du surnageant
d'hybridomes
Ig de chèvre
anti-IgG de rat

RÉSULTATS

1. Avant propos

Le but principal de ce projet de maîtrise était de produire et éventuellement de caractériser des AcMo contre les récepteurs Ly49E, F et H qui appartiennent tous au groupe de récepteurs apparentés à Ly49C. Ainsi que nous l'avons exposé dans la revue bibliographique, le récepteur Ly49C était, au début du projet, le seul des six membres du groupe à être reconnu par un AcMo qui lui soit spécifique (voir Figure 3). C'est d'ailleurs notre laboratoire qui est responsable de l'identification de l'hybridome 4LO3311 produisant cet anticorps (Lemieux *et al.*, 1991) et de la caractérisation de sa spécificité (Gosselin *et al.*, 1997). L'AcMo 4LO3311 est le seul des anticorps anti-Ly49 qui réagisse avec un épitope localisé dans la tige de la portion extracellulaire du récepteur (Brennan *et al.*, 1996). Cet AcMo bloque l'interaction du récepteur avec le ligand H-2K^b de façon aussi efficace qu'un anticorps qui réagit avec le CRD (Brennan *et al.*, 1996b). Par ailleurs, la réactivité de l'AcMo est perdue suite au changement d'une lysine (K) de l'épitope pour un résidu acide aspartique (E) tel que présent à cette position dans le récepteur Ly49I avec lequel l'AcMo ne réagit pas non plus (Lian *et al.*, 1999). Ces quelques précisions sont importantes dans le contexte du présent projet de maîtrise parce qu'elles supportent deux conclusions: 1) la tige comme le CRD peut jouer un rôle dans l'interaction récepteur/ligand, 2) une différence au niveau d'un seul résidu est suffisante pour déterminer la spécificité d'un anticorps.

Étant donné la forte homologie entre les récepteurs du groupe apparenté à Ly49C (Tableau I) et la réactivité croisée, avec au moins deux membres, de la majorité des AcMo qui reconnaissent des récepteurs de ce groupe (Figure 3), nous étions conscients qu'avec une approche classique, le risque était grand d'obtenir des réactifs ayant des propriétés analogues. Aussi, afin de favoriser l'identification des anticorps qui ne réagiraient que contre les récepteurs d'intérêt, nous avons décidé de développer une méthode de criblage utilisant des phages recombinants exprimant des séquences cibles de la tige et du CRD de la portion extracellulaire de ces récepteurs.

2. Détermination des séquences insérées dans les phages recombinants

Afin d'identifier les motifs les plus intéressants, toutes les séquences en acides aminés de la portion extracellulaire des récepteurs Ly49 identifiés chez la souris B6 ont été mises en parallèle avec celles des récepteurs clonés chez le rat. Des séquences de huit acides aminés ont été sélectionnées sur la base de plusieurs paramètres. Chacune devait d'abord avoir le moins d'homologie possible avec les autres récepteurs Ly49 et ne pas être présente dans aucune autre protéine qui pourrait être exprimée dans les cellules NK de la souris. Cette analyse a été effectuée avec le programme Blast (Basic Local Alignment Search Tool, de la base de données NCBI). Chaque séquence devait au minimum comporter au moins un acide aminé unique à une position donnée pour le récepteur concerné et dans la mesure du possible, cet acide aminé devait faire partie de ceux qui sont généralement déterminants dans la liaison antigène/anticorps. Cette considération s'appuie sur une étude portant sur la caractérisation épitopique d'une large banque d'anticorps monoclonaux réagissant avec la protéine hGH (human growth hormone) (Jin, Fendley et Wells, 1992). En mesurant les effets de mutations sélectives au sein des divers épitopes identifiés, les auteurs ont observé que la mutation d'acides aminés tels que les résidus tryptophane (W), arginine (R), proline (P), acide glutamique (D), acide aspartique (E), phénylalanine (F) et quelques autres mais à moindre titre, s'accompagnait fréquemment de la perte de la réactivité d'anticorps reconnaissant l'épitope original. Bien qu'elle soit intéressante, cette observation ne peut toutefois être considérée comme une règle absolue. À titre d'exemple, précisons que le résidu lysine (K) qui joue un rôle central dans la reconnaissance du récepteur Ly49C par l'AcMo 4LO3311 ne fait pas partie de ceux qui sont généralement déterminants dans la liaison antigène/anticorps et il est en outre flanqué de part et d'autre par des acides aminés qui ne le sont pas non plus (séquence SKT). Cependant, comme il n'y a que peu d'acides aminés uniques à des positions données dans la séquence des récepteurs qui nous intéressent (Tableau II), nous avons tenté de définir les bornes des séquences sélectionnées de façon à ce qu'elles contiennent un certain nombre d'acides aminés dont le rôle a plus de chance d'être déterminant dans la reconnaissance par un anticorps. Le choix des séquences a aussi pris en compte les conséquences potentielles de certaines substitutions sur la

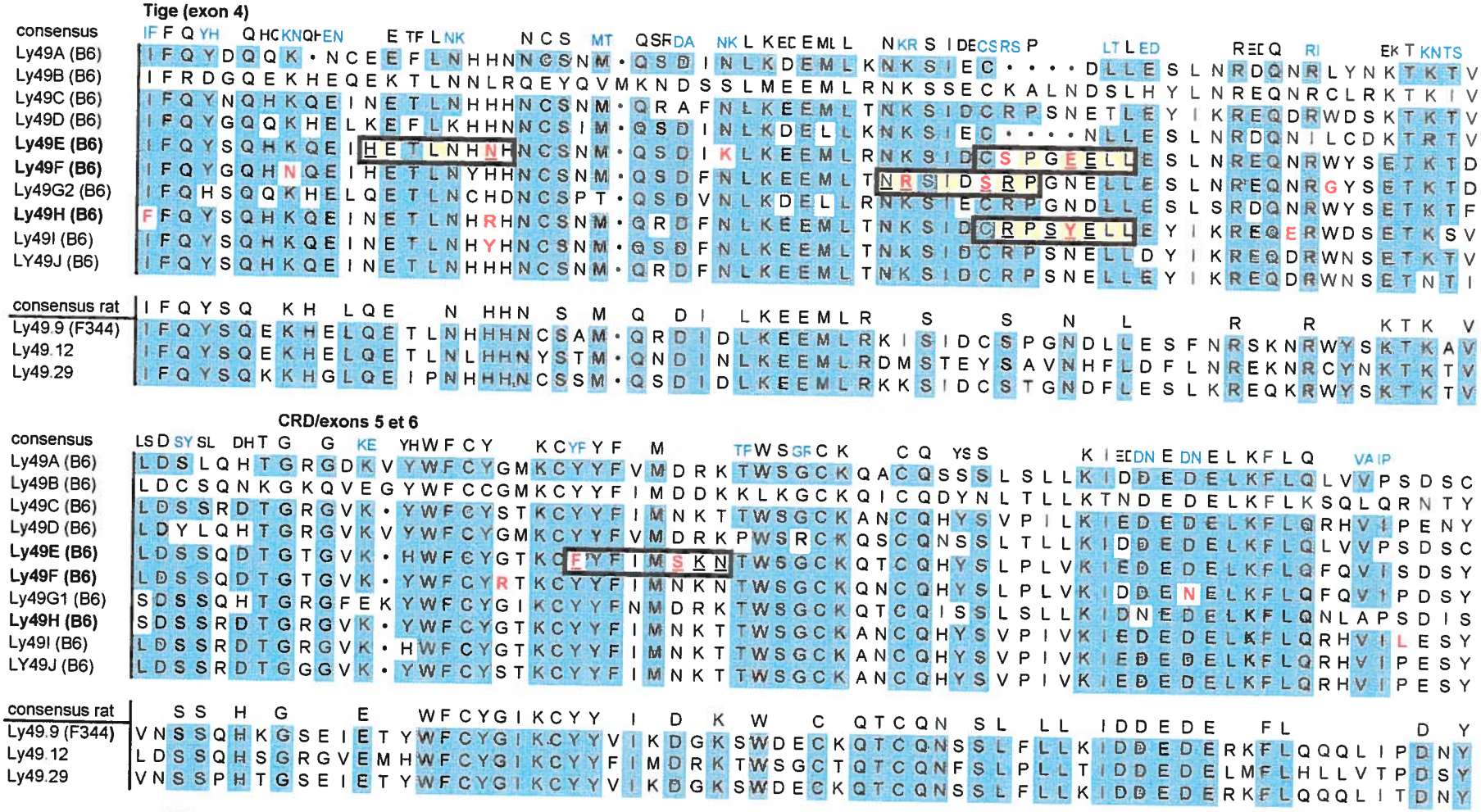
fonctionnalité du récepteur. Ainsi, nous ont paru intéressantes, les substitutions impliquant des changements, pertes ou additions de charge de même que les substitutions dans des régions peu polymorphes. Enfin, puisque les ADNc de trois récepteurs Ly49 ont été clonés chez le rat, nous avons bien entendu vérifié que les séquences sélectionnées n'y étaient pas présentes puisque ce sont des animaux de cette espèce qui seront immunisés.

La figure 6 illustre les séquences sélectionnées en les situant dans le contexte de tous les récepteurs Ly49 exprimés chez la souris B6. N'y sont pas présentes, les séquences correspondant aux produits des gènes *Ly49k, Ly49l, Ly49m* et Ly49*n* qui, chez cette souche de souris, sont plutôt considérés comme des pseudogènes (Makrigiannis et Anderson, 2001). Nous n'avons pas tenu compte non plus de la séquence du récepteur Ly49Q (GeneBank, # AB033769) dont l'ADNc a été cloné à partir de matériel provenant de la souris B6 mais dont l'expression n'a pas été confirmée. La séquence de Ly49B est présente, mais étant donné qu'elle est si différente des autres récepteurs Ly49, la séquence consensus n'a pas tenu compte de ce récepteur. Les codes d'identification des séquences cibles et les oligonucléotides correspondants ont été donnés dans la figure 4.

Cinq séquences ont été retenues pour le récepteur **Ly49E**, soit deux dans la tige codée par l'exon 4 et trois dans le CRD respectivement dans les portions codées par les exons 5, 6 et 7. La séquence **ET1** (CSPGEELL) contient deux acides aminés uniques par rapport à l'ensemble des récepteurs Ly49 de la souris B6. Toutefois, la sérine (S) en position 2 est présente dans la séquence consensus des récepteurs Ly49 du rat ce qui exclut sa pertinence dans le contexte de notre protocole d'immunisation. L'intérêt de la séquence s'articule donc autour de sa portion centrale PGEE, une séquence qui n'est présente dans aucun autre récepteur Ly49 murin, qui n'est pas présente non plus chez le rat et qui contient 3 acides aminés dont le rôle dans la liaison antigène/anticorps semblerait important (Jin, Fendley et Wells, 1992). La séquence **ET2** (HETLNHNH) contient une asparagine (N) en position 7, alors qu'à l'exception des récepteurs Ly49H qui exprime une arginine (R) et Ly49I qui a un résidu tyrosine (Y), tous les autres récepteurs Ly49 du rat et de la souris B6 ont un résidu histidine (H) à cette position. Outre la phénylalanine (F) unique en position 3', la séquence **EC1** (TNCNNSYF) codée par

Figure 6. Séquences en acides aminés de la portion extracellulaire des récepteurs Ly49 clonés chez la souris B6.

Les séquences sélectionnées dans la portion extracellulaire, composée de la tige et du CRD, sont encadrées. Les trois séquences Ly49 trouvées chez le rat sont également illustrées.



Légende:

= séquence consensus (excluant Ly49B)

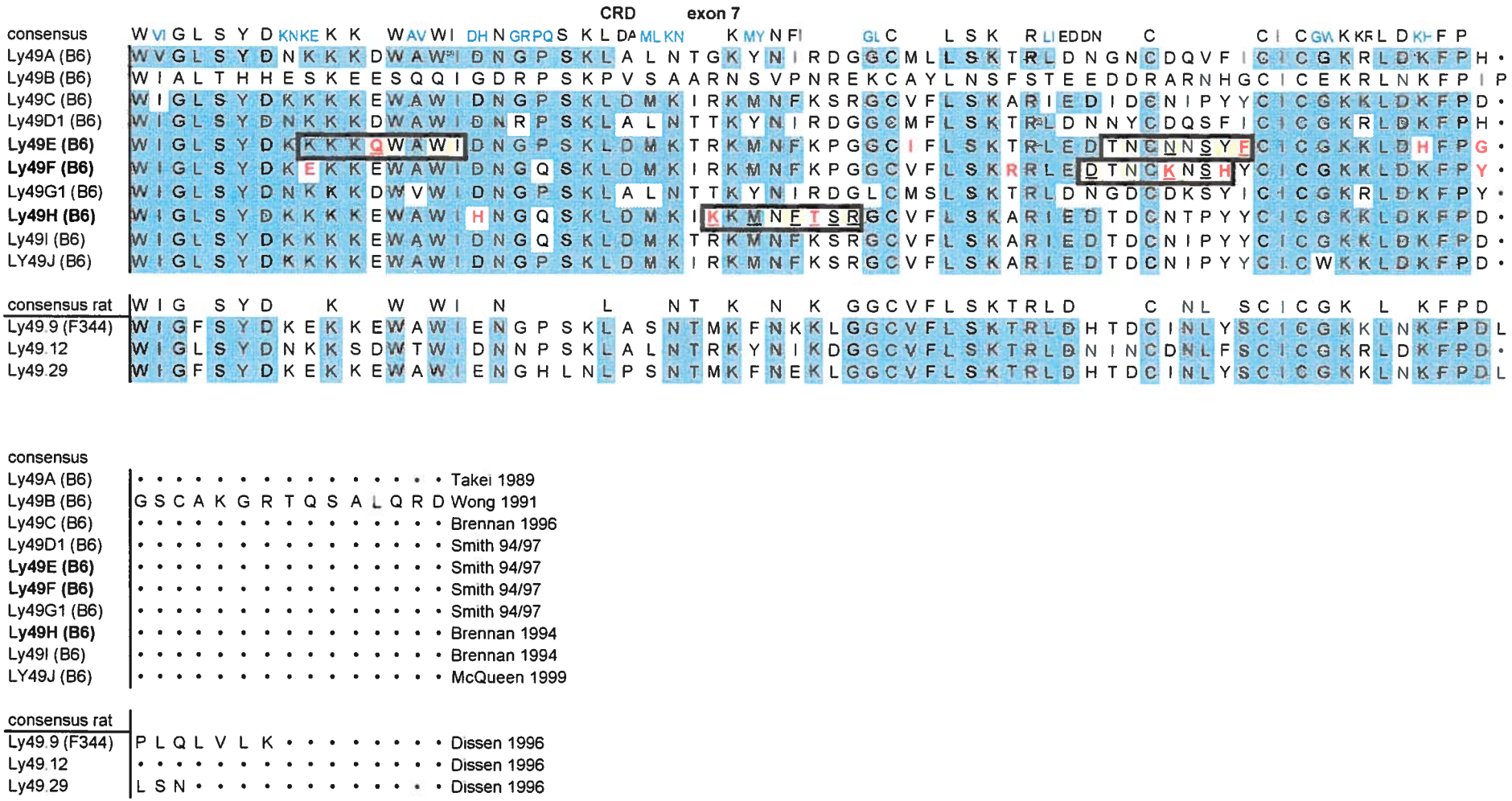
X = acides aminés uniques à leurs positions

= séquence sélectionnée pour la préparation de phages recombinants

X = résidus différents du rat

X = résidus déterminants dans la reconnaissance d'un épitope par un AcM

X = La première des deux lettres est la lettre la plus courante.
(indique qu'un seul récepteur ne contient pas la première lettre)


CRD
exon 7
consensus
Ly49A (B6)
Ly49B (B6)
Ly49C (B6)
Ly49D1 (B6)
Ly49E (B6)
Ly49F (B6)
Ly49G1 (B6)
Ly49H (B6)
Ly49I (B6)
LY49J (B6)
consensus rat
Ly49.9 (F344)
Ly49.12
Ly49.29
consensus
Ly49A (B6) Takei 1989
Ly49B (B6) Wong 1991
Ly49C (B6) Brennan 1996
Ly49D1 (B6) Smith 94/97
Ly49E (B6) Smith 94/97
Ly49F (B6) Smith 94/97
Ly49G1 (B6) Smith 94/97
Ly49H (B6) Brennan 1994
Ly49I (B6) Brennan 1994
LY49J (B6) McQueen 1999
consensus rat
Ly49.9 (F344) Dissen 1996
Ly49.12 Dissen 1996
Ly49.29 Dissen 1996

l'exon 7 révèle deux changements importants par rapport aux autres membres du groupe apparentés au Ly49C soit la présence d'une asparagine (N) en position 5 et une sérine (S) en position 6. Ces deux dernières substitutions sont également présentes dans le récepteur Ly49F. L'intérêt de la séquence **EC1** comme épitope potentiel d'un anticorps monoclonal réside donc dans sa partie 3' (NNSYF) dont 4 acides aminés sur 5 sont des acides aminés majeurs dans les liaisons antigène/anticorps et dont un lui est exclusif. La séquence **EC2** (FYFIMSKN) se situe dans la portion codée par l'exon 5. Elle possède deux résidus uniques à leur position soit: une phénylalanine (F) en position 5', position occupée par une tyrosine chez tous les récepteurs Ly49 connus quelle que soit l'espèce ou la souche concernée et une sérine (S) en position 6, laquelle est occupée par une asparagine (N) chez tous les autres récepteurs apparentés au Ly49C. Bien qu'il ne soit pas unique à cette position, le résidu asparagine (N) en position 3' est intéressant puisqu'il donne une séquence de 3 acides aminés qui n'est présente à cette position chez aucun autre récepteur Ly49 du rat ou de la souris. En outre, la substitution chez Ly49E et Ly49F d'un résidu asparagine (N) à la place du résidu thréonine (T) présent à cette position chez tous les autres récepteurs du groupe apparenté au Ly49C supprime un site potentiel de N-glycosylation. Cette séquence est donc une cible intéressante car elle pourrait être déterminante dans les propriétés du récepteur. La séquence **EC3** (KKKQWAWI) codée par l'exon 6 se situe dans une zone très conservée chez le rat comme chez la souris. La substitution d'une glutamine (Q) à la place d'un résidu chargé positivement soit l'acide aspartique (E) chez les récepteurs apparentés au Ly49C et l'acide glutamique (D) chez les récepteurs apparentés au Ly49A pourrait elle aussi avoir des conséquences sur les propriétés du récepteur. A noter que les trois récepteurs identifiés chez le rat possèdent eux aussi un acide aminé chargé négativement à cette position.

Pour le récepteur **Ly49F**, nous n'avons retenu que deux séquences respectivement codées par les exons 4 (tige) et 7 (CRD). Les deux contiennent 2 résidus uniques, exprimés à ces positions ni par les autres récepteurs Ly49 de la souris B6 ni par ceux du rat. Dans la séquence **FT** (NRSIDSRP), il y a d'abord une substitution d'une arginine (R) en position 2 alors que tous les autres récepteurs Ly49 de la souris B6 ont une lysine (K) à cette position. La charge étant identique, cette substitution n'a probablement pas de

conséquence fonctionnelle mais elle peut être déterminante pour la reconnaissance par un anticorps. Chez Ly49F comme chez les autres récepteurs Ly49 murins, les trois premiers acides aminés de cette séquence (NRS) constituent par ailleurs un site potentiel de *N*-glycosylation. Le remplacement d'une cystéine (C) consensus en position 6 par une sérine (S) pourrait être plus déterminante puisque ce changement peut être à l'origine de la suppression d'un lien intra ou interchaîne. En outre, il détermine en région 3' une séquence SRP qui n'est présente à cette position chez aucun autre membre de cette famille. Par rapport aux autres membres du groupe apparenté au récepteur Ly49C, les deux substitutions identifiées dans la séquence **FC** (DTNCKNSH) sont aussi en région 3': une lysine (K) remplace une asparagine (N) en position 5 de la séquence et une histidine (H) remplace une tyrosine (Y) en position 8. La séquence terminale ainsi définie (KNSH) en région 3' n'a qu'un acide aminé en commun avec la région analogue des récepteurs du rat. Cette séquence pourrait donc être intéressante à condition toutefois que cette région située dans une portion riche en résidus cystéine ne soit pas cryptique.

Pour le récepteur **Ly49H**, nous avons aussi retenu deux séquences cibles. La première exprimée au niveau de la tige d'où sa désignation **HT** (CRPSYELL) correspond au même site que ET1. Comme pour ET1, son intérêt s'articule autour du résidu en position 5 où une tyrosine (Y) remplace une asparagine (N) consensus chez les récepteurs Ly49 du rat et de la souris sauf chez Ly49E qui a un acide glutamique (E) à cette position. La séquence SYE ainsi définie est unique à cette position et elle n'a aucun résidu commun avec les récepteurs du rat. Nous avons eu plus de mal à identifier une séquence d'intérêt dans le CRD du récepteur Ly49H car ce récepteur ne possède que 4 acides aminés qui lui soient propres dans cette portion de la région extracellulaire (Figure 4). La séquence **HC** (KKMNFTSR) que nous avons retenue contient deux acides aminés uniques à leur position mais ils sont malheureusement assez distants l'un de l'autre. En position 1, une lysine (K) remplace une arginine (R) qui s'avère consensus à cette position parmi les récepteurs du groupe apparenté au Ly49C. La deuxième substitution intervient en position 6 où une thréonine (T) remplace une lysine (K) consensus chez tous les récepteurs du groupe apparenté au ly49C ou une arginine (R) chez ceux apparentés au Ly49A. Il s'agit donc d'une perte de charge positive qui peut avoir des conséquences sur

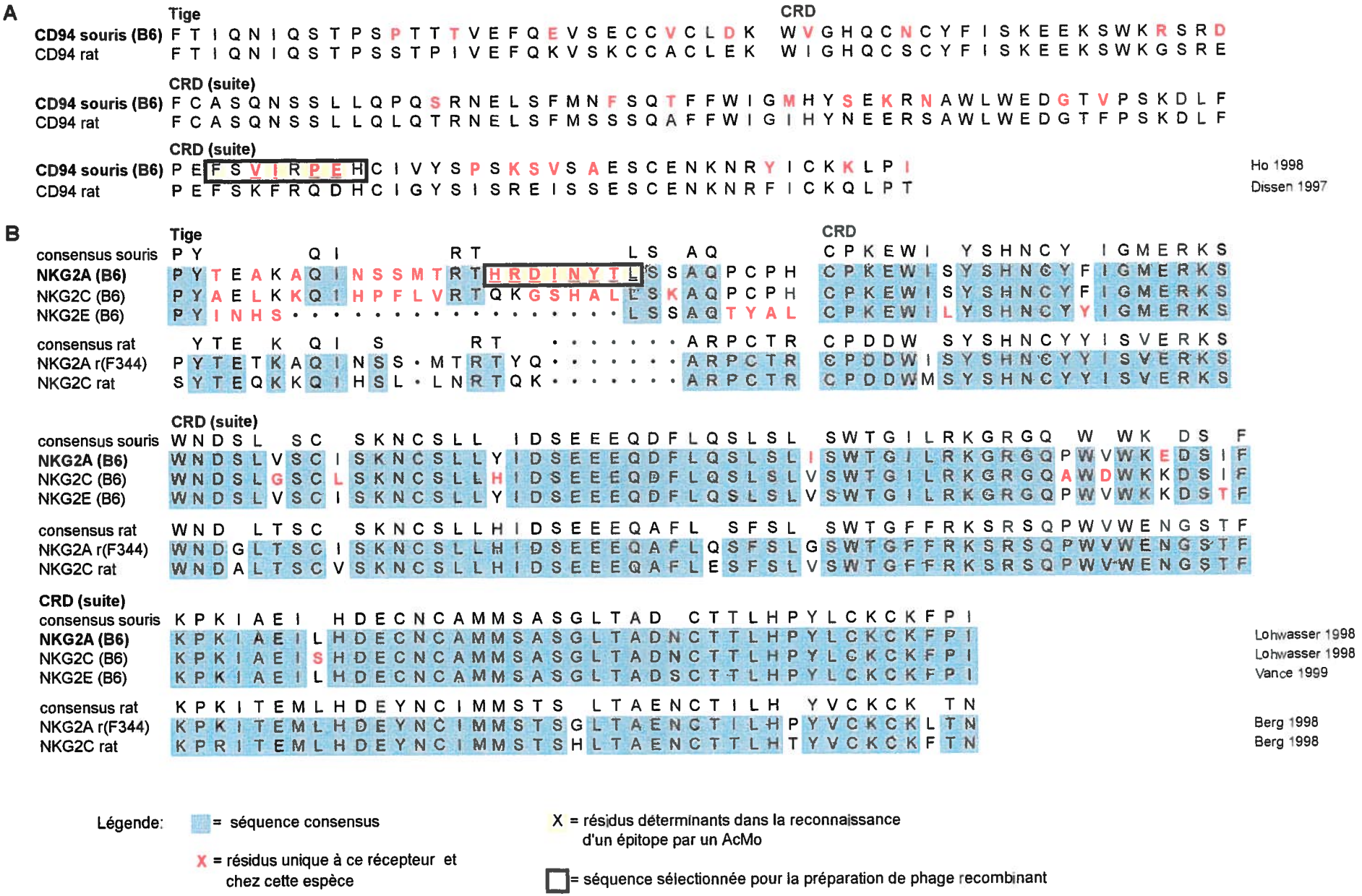
la fonctionnalité du récepteur. Par ailleurs cette substitution crée un site potentiel de *N*-glycosylation dans une région où aucun autre récepteur Ly49 n'en possède.

Ainsi que nous l'avons mentionné dans les objectifs du projet, nous avons ajouté un autre récepteur à notre plan principalement à cause du fait que les récepteurs Ly49E, F et H ne sont exprimés que sur des populations de petites tailles (Kubota *et al.*, 1999; Takei *et al.*, 2001) et que la détection d'anticorps contre des motifs précis de leurs séquences pourrait être difficile à atteindre. Pour valider le protocole de détection que nous avons élaboré, le récepteur CD94/NKG2A nous a semblé être le candidat idéal. D'abord, aucun réactif sélectif pour la chaîne polypeptidique NKG2A n'a été rapporté. De plus, lors d'une analyse par RT-PCR sur des cellules NK individuelles, des ARNm de CD94 et NKG2A ont été trouvés respectivement dans 40 et 35% des cellules (Takei *et al.*, 2001). Les séquences de la portion extracellulaire des polypeptides CD94 et NKG2 du rat et de la souris sont illustrées dans la figure 7. En ce qui concerne la chaîne **CD94**, malgré que l'homologie entre celle du rat et de la souris soit assez grande, nous avons identifié un motif intéressant dans le CRD. La séquence FSVIRPEH de la souris possède en effet 4 acides aminés différents de la région correspondante chez le rat et ceux-ci s'articulent de part et d'autre d'une arginine (R) commune créant ainsi le motif unique VIRPE dont les quatre derniers résidus sont jugés importants dans la réaction antigène/anticorps.

Enfin le NKG2A nous a semblé être un candidat parfait puisque, au plan structural, alors que le CRD des trois molécules de la famille NKG2 chez la souris est très peu polymorphe, la tige de la chaîne polypeptidique de **NKG2A** contient un motif particulièrement attrayant: 1) la séquence HRDINYTL n'a d'abord aucune homologie avec les séquences NKG2A ou NKG2C du rat dans la portion 5' de l'épitope déterminé ; 2) dans la portion 3' de l'épitope choisi, les récepteurs chez le rat portent une délétion; 3) les résidus présents aux sept premières positions de la séquence sont différents de ceux présents dans la chaîne NKG2C de la souris et la séquence NKG2E de la souris présente une délétion complète dans cette portion; 4) tous les acides aminés de la séquence cible sont considérés être des résidus déterminants dans la réaction antigène/anticorps.

Figure 7. Séquences en acides aminés de la portion extracellulaire des récepteurs CD94/NKG2.

Cette figure illustre les séquences en acides aminés dans la portion extracellulaire des molécules CD94 (**A**) et NKG2 (**B**) et chez la souris. Dans chacun des cas, la séquence consensus chez le rat est indiquée. Le choix des épitopes pour le NKG2A et le CD94 est basé sur les mêmes critères de sélection que dans le cas des récepteurs Ly49.


A
Tige
CRD
CD94 souris (B6) F T I Q N I Q S T P S P T T T V E F Q E V S E C C V C L D K W V G H Q C N C Y F I S K E E K S W K R S R D
CD94 rat F T I Q N I Q S T P S S T P I V E F Q K V S K C C A C L E K W I G H Q C S C Y F I S K E E K S W K G S R E
CRD (suite)
CD94 souris (B6) F C A S Q N S S L L Q P Q S R N E L S F M N F S Q T F F W I G M H Y S E K R N A W L W E D G T V P S K D L F
CD94 rat F C A S Q N S S L L Q L Q T R N E L S F M S S S Q A F F W I G I H Y N E E R S A W L W E D G T F P S K D L F
CRD (suite)
CD94 souris (B6) P E F S V I R P E H C I V Y S P S K S V S A E S C E N K N R Y I C K K L P I
CD94 rat P E F S K F R Q D H C I G Y S I S R E I S S E S C E N K N R F I C K Q L P T
Ho 1998
Dissen 1997
B
Tige
CRD
consensus souris P Y Q I R T L S A Q C P K E W I Y S H N C Y I G M E R K S
NKG2A (B6) P Y T E A K A Q I N S S M T R T H R D I N Y T L S S A Q P C P H C P K E W I S Y S H N C Y F I G M E R K S
NKG2C (B6) P Y A E L K K Q I H P F L V R T Q K G S H A L L S K A Q P C P H C P K E W I S Y S H N C Y F I G M E R K S
NKG2E (B6) P Y I N H S . . . . . L S S A Q T Y A L C P K E W I L Y S H N C Y Y I G M E R K S
consensus rat Y T E K Q I S R T . . . . . A R P C T R C P D D W S Y S H N C Y Y I S V E R K S
NKG2A r(F344) P Y T E T K A Q I N S S . M T R T Y Q . . . . . A R P C T R C P D D W I S Y S H N C Y Y I S V E R K S
NKG2C rat S Y T E Q K K Q I H S L . L N R T Q K . . . . . A R P C T R C P D D W M S Y S H N C Y Y I S V E R K S
CRD (suite)
consensus souris W N D S L S C S K N C S L L I D S E E E Q D F L Q S L S L S W T G I L R K G R G Q W W K D S F
NKG2A (B6) W N D S L V S C I S K N C S L L Y I D S E E E Q D F L Q S L S L I S W T G I L R K G R G Q P W V W K E D S I F
NKG2C (B6) W N D S L G S C L S K N C S L L H I D S E E E Q D F L Q S L S L V S W T G I L R K G R G Q A W D W K K D S I F
NKG2E (B6) W N D S L V S C I S K N C S L L Y I D S E E E Q D F L Q S L S L V S W T G I L R K G R G Q P W V W K K D S T F
consensus rat W N D L T S C S K N C S L L H I D S E E E Q A F L S F S L S W T G F F R K S R S Q P W V W E N G S T F
NKG2A r(F344) W N D G L T S C I S K N C S L L H I D S E E E Q A F L Q S F S L G S W T G F F R K S R S Q P W V W E N G S T F
NKG2C rat W N D A L T S C V S K N C S L L H I D S E E E Q A F L E S F S L V S W T G F F R K S R S Q P W V W E N G S T F
CRD (suite)
consensus souris K P K I A E I H D E C N C A M M S A S G L T A D C T T L H P Y L C K C K F P I
NKG2A (B6) K P K I A E I L H D E C N C A M M S A S G L T A D N C T T L H P Y L C K C K F P I
NKG2C (B6) K P K I A E I S H D E C N C A M M S A S G L T A D N C T T L H P Y L C K C K F P I
NKG2E (B6) K P K I A E I L H D E C N C A M M S A S G L T A D S C T T L H P Y L C K C K F P I
consensus rat K P K I T E M L H D E Y N C I M M S T S L T A E N C T I L H Y V C K C K T N
NKG2A r(F344) K P K I T E M L H D E Y N C I M M S T S G L T A E N C T I L H P Y V C K C K L T N
NKG2C rat K P R I T E M L H D E Y N C I M M S T S H L T A E N C T T L H T Y V C K C K F T N
Lohwasser 1998
Lohwasser 1998
Vance 1999
Berg 1998
Berg 1998
Légende:
= séquence consensus
X = résidus unique à ce récepteur et chez cette espèce
X = résidus déterminants dans la reconnaissance d'un épitope par un AcMo
= séquence sélectionnée pour la préparation de phage recombinant

A titre de témoin négatif, nous avons choisi une séquence de huit résidus valine qui sera elle aussi insérée dans un vecteur phagique. Aucun récepteur Ly49 de la souris ne contient un tel motif pas plus d'ailleurs qu'aucune autre protéine de cette espèce.

3. ELISA

Étant donné que les immunisations allaient être effectuées avec une préparation hétérogène de cellules, des anticorps pouvaient être générés contre un très grand nombre d'antigènes. Il fallait donc développer un test qui soit hautement spécifique pour sélectionner uniquement les hybridomes produisants des AcMo anti-Ly49 ou anti-CD94/NKG2A. Un test de type ELISA indirect a été mis au point avec les outils disponibles. Les résultats principaux sont abordés.

Tel que mentionné à la section 5 de la méthodologie, plusieurs paramètres du test ELISA ont pu être établis à l'aide de l'anticorps monoclonal de souris F9 dont on connaissait la réactivité avec le phage M1. Pour cette mise au point, les plaques ont été enrobées avec un anticorps de chèvre anti-souris. La concentration adéquate en immunoglobuline de souris (F9) ainsi que la concentration de l'Ac anti-M13 biotinylé ont d'abord été déterminées. Une gamme allant de 1 ηg/ml à 10 μg/ml a été testée dans le cas de l'anticorps F9 et des dilutions de 1/1000 et 1/3000 ont été utilisées pour l'anticorps de mouton anti-M13 biotinylé. Les puits n'ayant pas d'IgG de souris ont montré une densité optique très faible, ce qui reflète que le phage recombinant M1 ne se fixe pas de manière non spécifique à l'Ac de chèvre anti-souris. Le seuil de sensibilité du test a été évalué à 100 ηg/ml (résultat non-illustré). Par ailleurs, les densités optiques obtenues pour l'anti-M13 biotinylé, ont révélé une réaction plus forte avec la dilution 1/1000 que pour 1/3000.

Dans une seconde étape, différentes quantités de phages M1 ont été utilisées afin de trouver le nombre minimal requis pour qu'un signal puisse être décelé. Cette analyse avait également pour but d'évaluer la spécificité du test. Le phage CT1, exprimant la séquence QDRWDSKT, a servi de témoin négatif. Ce phage exprimant une séquence de Ly49C, il n'est donc pas reconnu par l'anticorps F9. Une gamme croissante de phages, allant de 5 à 100 x 10^9 phages, a été utilisée pour chacun des phages. Les résultats illustrés

à la figure 8A montrent qu'une D.O suffisante est obtenue avec 5 x 10^9 phages M1. La D.O est demeurée au niveau basal dans les puits contenant le phage témoin CT1, ce qui confirme la spécificité du test.

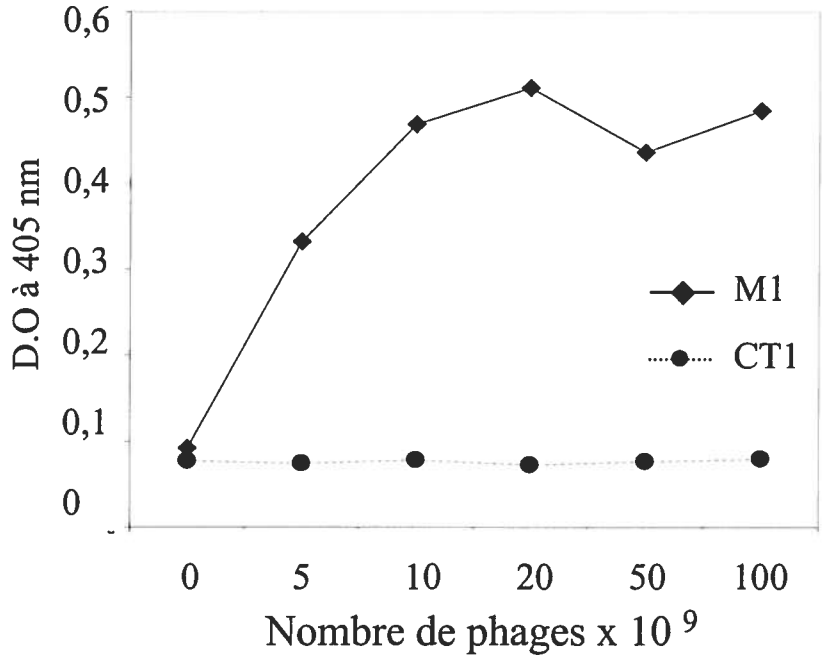
Les animaux étant immunisés avec des cellules, il allait être théoriquement possible de sélectionner plusieurs hybridomes à partir d'une même fusion. Nous nous sommes donc assurés de pouvoir ajouter plusieurs phages recombinants à la fois lors du criblage. À cet effet, nous avons d'abord vérifié si la présence de phages non-spécifiques pouvait interférer avec la rétention d'un seul phage spécifique par l'AcMo F9. Chaque phage recombinant a été utilisé à la concentration de 5x10^9 phages/puits. Des mélanges, comportant le phage M1 (5 x 10^9 phages/puits) avec des multiples de 1 à 7 fois 5 x 10^9 phages/puits du phage CT1, ont été faits. Les résultats montrent que dans toutes les conditions testées, la présence des phages non-spécifiques n'altère pas la détection du phage spécifique (Figure 8B). Il est donc possible de mélanger jusqu'à 8 phages à la fois sans qu'il y ait encombrement. Un mélange de plusieurs phages pouvait donc être effectué pour permettre un criblage initial efficace des surnageants d'hybridomes sans avoir à tester chacun des phages individuellement. Lors des premières fusions, 7 phages recombinants (ET1, EC1, FT, FC, HT, HC et 2AT) ont été utilisés dans un mélange appelé pool I. L'analyse des volumes et des concentrations des autres constituants du test n'est pas décrite en détails, mais tous les paramètres établis sont énumérés dans le tableau VII.

Lors des tests de criblage, un témoin positif impliquant des Ac de rat s'imposait. Le sérum d'un rat (A3) immunisé deux fois avec des cellules LAK (A3-2) a réagi fortement autant contre les pools de phages que contre chacun des phages individuels. Ce sérum nous a donc servi de témoin positif pour tous les tests de criblage.

Figure 8. Établissement des conditions optimales d'utilisation des phages recombinants pour le test ELISA.

Le graphique **A** illustre la quantité de phages minimale pouvant être décelée dans le test ELISA. Le phage M1 est un phage reconnu par l'anticorps F9 alors que le phage CT1 est le témoin négatif. Le graphique **B** illustre la détection d'un signal pour le seul phage spécifique en présence qu'une quantité croissante de phages non-spécifiques.

A


0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
D.O à 405 nm
M1
CT1
0
5
10
20
50
100
Nombre de phages x 10 9

B

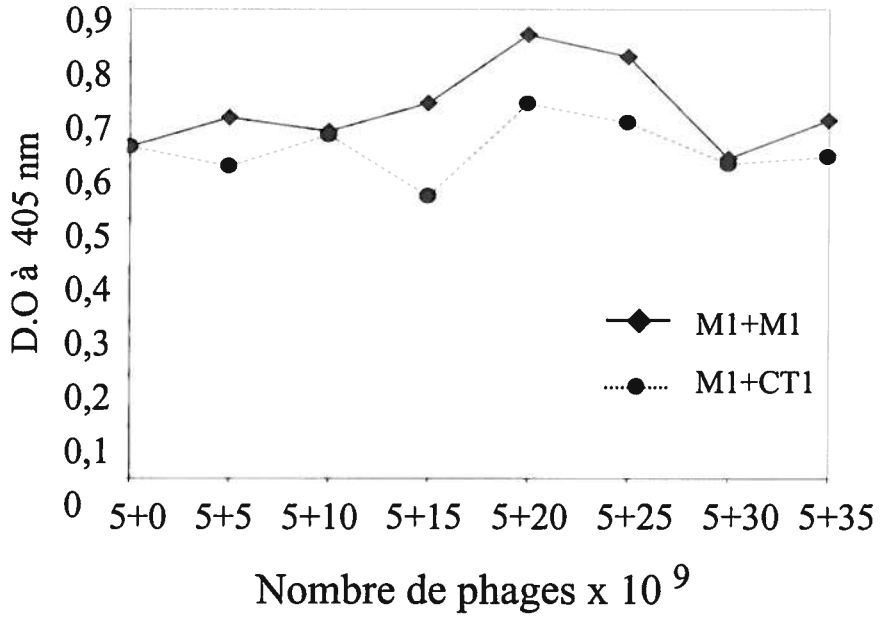

0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
D.O à 405 nm
M1+M1
M1+CT1
5+0
5+5
5+10
5+15
5+20
5+25
5+30
5+35
Nombre de phages x 10 9

Tableau VII. Conditions optimales pour le test ELISA

Composantes	Concentrations	Volume (µl/puits)
Anticorps chèvre anti-souris ou **Anticorps chèvre anti-rat**	4 µg/ml	50
IgG de souris (F9)* ou **Surnageants d'hybridomes** ou **Séra**	100 ηg/ml --- dilution 1/50 à 1/1000	100
Phage recombinant (M1)* ou **Phages individuels**	5 x 10^9 phages/puits	10
Mélange de phages spécifiques et non-spécifiques (M1 et CT1) ou **Pool de phages**	5 x 10^9 phages M1/puits + (1 à 7) * 5 x 10^9 phages CT1/puits ou (1 à 8) * 5 x 10^9 phages/puits	10
Anticorps mouton anti-M13 biotynylé	1/1000	75
SA-HRP	1/1000	100
ABTS	0,5 µg/ml	75

Ce tableau résume les conditions dans lesquelles l'analyse par ELISA a été effectuée.

(*) : l'IgG de souris, les surnageants d'hybridomes ou les séra ont été ajoutés dans les puits en même temps que les phages et ces constituants ont subi une agitation toute la nuit.

4. Stratégies d'immunisations

Diverses stratégies d'immunisation ont été employées pour la production d'AcMo. De nombreuses fusions ont été effectuées et les conditions expérimentales pour chacune d'elles sont exposées dans le tableau VIII. Les paramètres principaux y sont énoncés. Deux types de rats ont été utilisés pour les injections soient les rats Fisher, exprimant trois récepteurs Ly49 et un rat DA, n'exprimant pas de récepteurs Ly49 (Dissen *et al.*, 1996). La voie d'injection des immunogènes a varié. Les immunisations avec les cellules LAK ont été faites soit par voie sous-cutanée soit par voie intrapéritonéale. Des injections intramusculaires ont aussi été employées dans le cadre des immunisations avec les phages en présence d'adjuvant TiterMaxGold (rat F4). Deux partenaires de fusion ont été utilisés : des cellules sp2/0 ont été utilisées pour la première fusion et les cellules P3X63Ag8.653 (653) ont été employées pour les fusions suivantes. Lors de la préparation des cellules spléniques, les globules rouges ont été lysés seulement lors de la fusion F0, mais cette étape a été supprimée au cours des fusions suivantes pour ne pas fragiliser les membranes des cellules spléniques. La présence de globules rouges dans la suspension n'a nuit en aucun cas à la croissance des hybridomes, de toute façon ils sont détruits dans les premiers jours de sélection au HAT. La concentration de cellules par puits a, dans un cas, été diminuée par rapport à ce que recommande le CPI (Current Protocol in Immunology, 1991, p. 2.5.1-2.5.17). Cette pratique a été utilisée dans le but de diminuer l'expansion des fibroblastes dans les plaques de fusion impliquant un rat plus âgé (DA-3). Les deux seules conditions qui sont restées stables ont été le maintien des cellules spléniques et des cellules myélomateuses dans un ratio 10 :1 et la réalisation de la fusion 3 jours après la dernière immunisation.

Tableau VIII. Conditions expérimentales pour les différentes fusions

Rats	Immunogènes	Nombre d'immunisations *	Myélome	Ensemencement (cellules/ml)	Phages utilisés pour le criblage
F0	LAK	5	Sp2/0-Ag14	2.5×10^6	Pool I **
F2	LAK	3	P3X63Ag8.653	2.5×10^6	Pool I
F1	LAK	4	P3X63Ag8.653	2.0×10^6	Pool I
DA-3	LAK + phages pool I **	3 + 1	P3X63Ag8.653	1.0×10^6	Pool I et V
F5	LAK + phage 2AT	1 + 1	P3X63Ag8.653	2.5×10^6	2AT et V
F4	LAK + phage 2AT /TiterMaxGold + phage 2AT	2 + 2 + 1	P3X63Ag8.653	2.5×10^6	2AT et V
F7	Thymocytes fœtaux de 17 jours, 6 jours en culture	2	P3X63Ag8.653	2.5×10^6	Pool II *** et V
F6	Thymocytes fœtaux de 17 jours, 7 jours en culture	2	P3X63Ag8.653	2.5×10^6	Pool II et V

* Tous les détails concernant le calendrier des immunisations ont été exposés dans les tableaux IV à VI.

** pool I : phages ET1, EC1, FT, FC, HT, HC et 2AT

*** pool II : phages ET1, ET2, EC1, EC2, EC3, CD94 et 2AT

4.1 Utilisation des cellules LAK en tant qu'immunogènes

La stratégie initiale pour la production d'un AcMo contre les récepteurs NK Ly49E, Ly49F et Ly49H était d'utiliser des cellules LAK en tant qu'immunogènes. Par des analyses sur un échantillon de 1000 cellules NK adultes, Kubota et collaborateurs (1999b) ont rapporté la détection d'ARNm, pour ces trois récepteurs. Les récepteurs Ly49 étant exprimés sur des sous-populations chevauchantes de cellules NK/LAK, il était ainsi possible de viser plusieurs récepteurs à la fois et conséquemment de générer des AcMo contre la panoplie des récepteurs ciblés. De plus, étant donné que les cellules NK/LAK expriment le récepteur CD94/NKG2A à 35% et qu'on avait identifié une séquence pertinente, cet hétérodimère était également visé, dès le début des expérimentations, pour la production d'AcMo.

Des cellules NK ont été enrichies afin de procéder aux diverses immunisations. Après 9 jours en culture en présence d'IL-2, nous avons vérifié la fréquence des cellules exprimant le marqueur NK1.1 avec l'anticorps PK136 par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules positives était de plus de 85%, ce qui est conforme aux attentes (Figure 9). La vérification des cellules LAK, pour ce marqueur a été effectuée avant chaque immunisation, et des rendements semblables ont été obtenus.

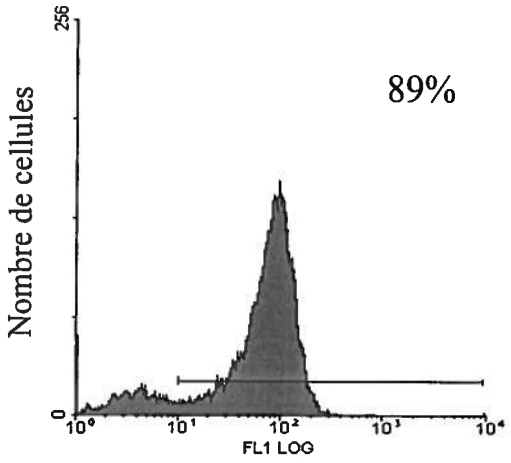
4.1.1 Analyse des séra

Les sera pré-immuns et les séra immuns prélevés 10 jours après chaque immunisation ont servi à la recherche d'une réactivité avec les cellules LAK par cytométrie en flux et d'une réactivité avec des mélanges de phages recombinants par un test ELISA. Ces tests permettaient de mieux choisir l'animal à utiliser pour une fusion.

Dès la première immunisation avec des cellules LAK, tous les rats ont produit des Ac réagissant avec les cellules LAK (Figure 10). Pour ceux qui ont été immunisés par voie sous-cutanée (Tableau IV), les doses de 6×10^6 et de 12.5×10^6 cellules donnent des résultats équivalents. La réponse des rats immunisés par voie intrapéritonéale (F4 et F5) a

Figure 9. Fréquence des cellules exprimant le marqueur NK1.1 dans une culture de cellules LAK de souris B6, cultivées 9 jours en présence d'IL-2.

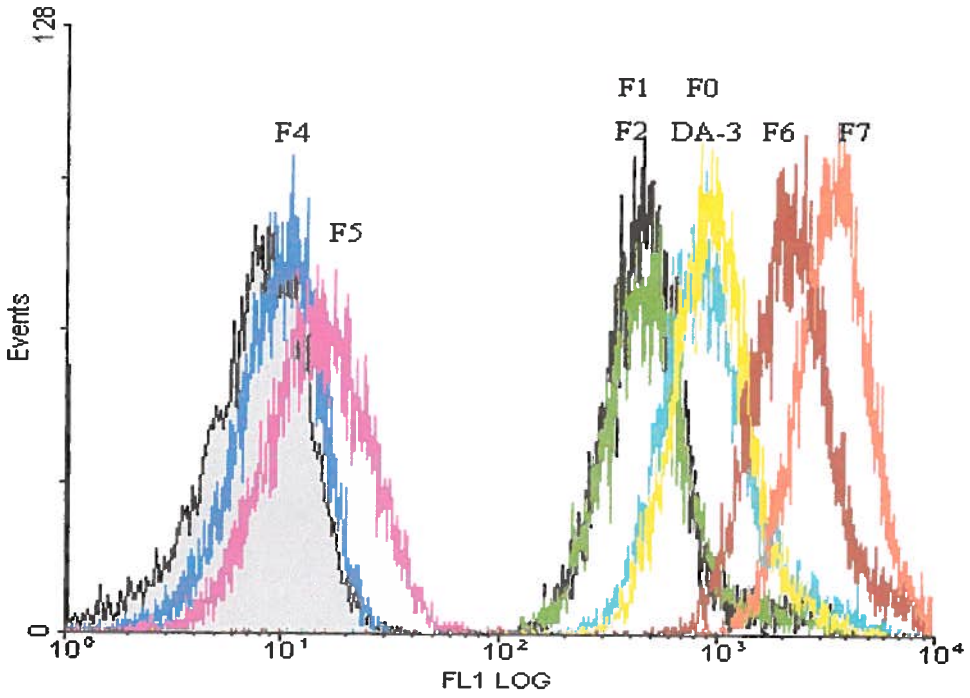
Les cellules ont été incubées avec l'anticorps PK136 conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).



NK1.1

Figure 10. Analyse par cytométrie en flux de la réactivité des séra immuns avec des cellules LAK.

Les données illustrées correspondent à la dilution 1/100 des séra immuns des rats Fisher (F0, F1, F2, F4, F5, F6 et F7) ou DA (DA-3). Les séra ont été prélevés 10 jours après la première immunisation avec des cellules LAK (F0, F1, F2, F4, F5 et DA-3) ou après la première immunisation avec des cellules fœtales (F6 et F7). Les cellules LAK utilisées pour l'analyse sont des cellules NK spléniques cultivées 5 jours en présence d'IL-2. La zone ombragée correspond à la valeur témoin établie par l'incubation des cellules LAK avec un sérum pré-immun dilué 1/100. Les cellules positives sont révélées avec un anticorps de chèvre anti-IgG de rat couplé au FITC.



Ig de chèvre anti-IgG de rat

par ailleurs été plus faible. Celle-ci se rétablit toutefois après un premier rappel ainsi qu'en témoigne la réactivité du sérum F4 prélevé après la seconde immunisation (résultat non-illustré). Ces observations confirment donc que les conditions d'immunisation permettaient la production d'anticorps contre des récepteurs exprimés à la surface des cellules LAK.

Alors que les séra pré-immuns ne démontraient aucune réactivité, lors des tests ELISA à des dilutions de 1/50 et 1/100, les séra immuns prélevés après les 3 premières immunisations des rats F0 et F2 ont réagi fortement avec un mélange de phages contenant les phages ET1, EC1, FT, FC, HT, HC et 2AT. Testés individuellement contre chacun des phages du mélange, ces séra ont réagi dans toutes les conditions. Comme il était peu probable que tous les épitopes sélectionnés aient suscité la production d'anticorps, nous avons plutôt suspecté une réactivité croisée contre un motif commun à une protéine des cellules LAK et à une protéine de la capside du phage. Ceci a pu être confirmé après avoir produit un phage témoin négatif exprimant un épitope constitué de 8 résidus valine. Les séra immuns du rat F1 n'ont aucunement réagi avec les phages. De façon aléatoire, le rat F0 a été désigné le premier à être utilisé pour la fusion, le rat F2 a été utilisé à la fusion suivante.

4.1.2 Fusions et criblage des surnageants d'hybridomes

Pour les fusions effectuées avec les rats immunisés uniquement avec les cellules LAK, seuls les phages exprimant les séquences ET1 et EC1 du récepteur Ly49E ont été inclus dans le mélange test qui contenait aussi les deux séquences pour les récepteurs Ly49F (FT et FC) et Ly49H (HT et HC) et une séquence pour le récepteur CD94/NKG2A. Le criblage des surnageants d'hybridomes a donc été effectué avec un mélange de 7 phages, appelé pool I.

Le premier rat Fisher (F0) utilisé pour une fusion a été immunisé quatre fois, dans un intervalle de 7 mois, avec différentes doses de cellules LAK (6 à 27 x 10^6 cellules), le dernier rappel ayant été fait avec 1 x 10^7 cellules. Des hybridomes ont été décelés dans

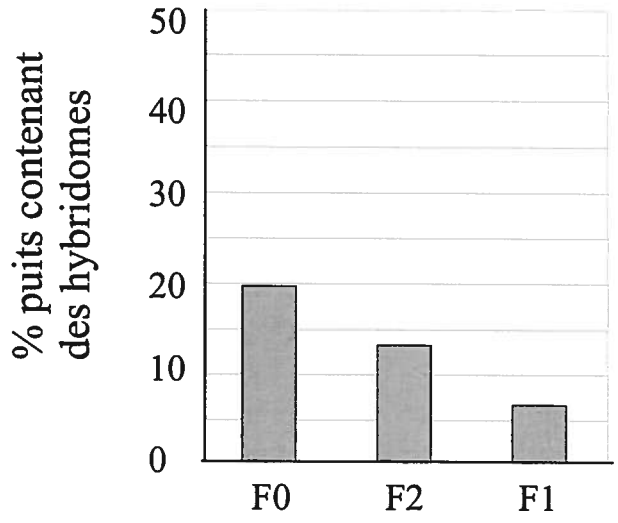
20% des puits (Tableau IX). Les puits dans lesquels les hybridomes avaient atteint une croissance minimum de 25% ont été testés en ELISA. Pour cette fusion, la sécrétion d'Ig n'a pas été évaluée. Aucun surnageant des 51 puits testés n'a présenté de spécificité pour le mélange de phages recombinants (pool I). Notre laboratoire ayant eu par le passé du succès dans la production d'hybridomes en utilisant le partenaire de fusion P3X63Ag8.653 (Lemieux *et al.*, 1991; Depatie *et al.*, 1999) nous y avons eu recours pour toutes les fusions subséquentes. Ces cellules sont d'ailleurs un partenaire de fusion recommandé pour la formation d'hétérohybridomes et il semble que ces cellules soient beaucoup plus vigoureuses en culture.

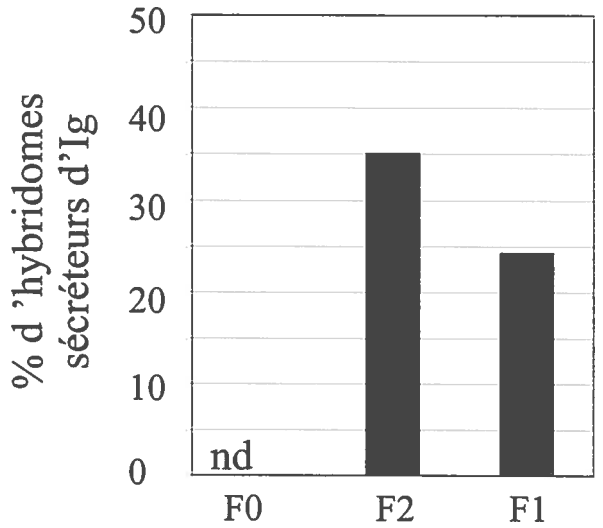
Quelques changements ont été apportés lors de la fusion F2. Tout d'abord les injections de rappel ont été faites par voie intrapéritonéale. Ensuite, il n'y a pas eu lyse des globules rouges. Les rendements sont présentés au tableau IX. Une croissance d'hybridomes a été décelée dans 51 des 384 puits testés, ce qui donne un pourcentage d'hybridomes d'environ 13%. Sur les 43 puits testés, 15 contenaient des hybridomes sécréteurs d'Ac donnant un rendement de 35%. Certains des surnageants de ces hybridomes sécréteurs d'Ac ont réagi avec les mélanges de phages, mais de manière non reproductible. Dans les derniers tests, aucun surnageant n'a réagi avec le mélange de phages. Les rendements obtenus sont très en dessous des valeurs attendues. Selon le CPI, dans une fusion faite avec des cellules d'animaux immunisés avec des antigènes cellulaires, nous devrions nous attendre à avoir environ 50% des puits contenant des hybridomes et 30% à 50% de ceux-ci devraient être des hybridomes sécréteurs d'anticorps. Toutefois, les chances d'avoir un anticorps de la spécificité désirée ne sont que de 1% à 2% (Current Protocol in Immunology, 1991, p. 2.5.1-2.5.17).

Pour les fusions F0 et F2, dès les premiers jours en culture des cellules spléniques fusionnées avec les cellules myélomateuses, au moins la moitié des plaques ont été malheureusement contaminées par des moisissures et ont dû être éliminées. Les rendements pour les fusions F0 et F2 ont été calculés sur les plaques restantes.

Tableau IX. Rendements obtenus pour les fusions impliquant les rats immunisés avec des cellules LAK.

Fusion	Nombre de puits ensemencés	Puits avec des hybridomes	Puits testés	Hybridomes sécréteurs d'Ac	Hybridomes spécifiques aux phages
F0 (02/03/00)	480	95	51	Nd	0
F2 (20/05/00)	384	51	43	15	0
F1 (20/07/00)	960	64	39	9	0





Tel que mentionné précédemment, les sera immuns du rat F1 ont réagi avec les cellules LAK. Mais, une réactivité avec les phages n'a jamais pu être observée par le test ELISA. Néanmoins, étant donné que ce test est beaucoup plus sensible pour la détection des Ig, et que la concentration d'Ac d'une spécificité donnée n'est peut-être pas assez élevée dans le sérum, nous avons décidé d'utiliser les cellules spléniques de ce rat pour une fusion malgré l'absence de réactivité du sérum contre le mélange de phages en ELISA. Les résultats de la fusion sont présentés au tableau IX. Neuf cent soixante puits ont été ensemencés et des hybridomes ont été observés dans seulement 64 puits, ce qui donne un rendement de 6,6%. Lors du criblage, 39 puits ont été testés pour la sécrétion d'Ig et pour la réactivité avec les phages. Neuf puits contenaient des hybridomes sécréteurs d'Ac, mais aucun n'a été spécifique aux phages. Les surnageants de trois puits ont réagi contre le mélange de phages (pool I) dans les deux premiers tests ELISA, mais la réactivité a disparu dans les tests suivants. Bien qu'il n'y ait pas eu de contamination au cours de cette fusion, les rendements en hybridomes et en sécrétion d'Ig étaient de nouveau bien en dessous des valeurs attendues.

En résumé, pour les 3 fusions effectuées avec les cellules spléniques de rats immunisés plusieurs fois avec des cellules LAK, autant le nombre de puits contenants des hybridomes que ceux ayant des hybridomes sécréteurs d'Ac a été très faible. Étant donné que nous n'avions pas l'assurance que les récepteurs Ly49E, Ly49F et Ly49H soient exprimés sur un nombre suffisant de cellules NK/LAK et que les séquences retenues pour la production des phages recombinants ne présentaient pas plus de 2 acides aminés uniques, les conditions utilisant seulement les cellules LAK comme immunogènes semblaient inadéquates. Nous avons donc changé de stratégie.

4.2 Utilisation des cellules LAK et des phages recombinants comme immunogènes

La seconde stratégie employée a été d'utiliser des phages recombinants pour les injections de rappel. De cette façon, les épitopes ciblés, théoriquement déjà rencontrés antérieurement sur les cellules LAK, étaient présentés de façon plus sélective dans le contexte de la protéine pIII du phage recombinant. Celui-ci sert dès lors de transporteur.

Cette technique permettait également de cibler plusieurs récepteurs à la fois par l'immunisation avec plusieurs phages. Cependant, afin de bien discriminer les hybridomes réagissant contre les particules phagiques de ceux réagissant avec l'épitope inséré dans la protéine pIII, la construction d'un phage témoin était nécessaire. Pour ce faire, une séquence de huit résidus valine a été insérée dans la protéine pIII du vecteur fUSE5. Ce phage a été nommé phage V. Avant d'entreprendre la production de ce phage, la séquence polyvaline a été vérifiée avec le programme Blast (Basic Local Alignment Search Tool, de la base de données NCBI). Pour qu'il n'y ait pas de réactivité croisée, il fallait nous assurer que cette séquence ne corresponde ni à une protéine quelconque du phage fUSE5 ni à une protéine quelconque de souris qui pourrait être exprimée sur les cellules NK. De cette façon, le criblage des surnageants d'hybridomes a été facilité. La dose de phage injectée, la voie d'inoculation et l'utilisation ou non d'un adjuvant, ont été basées sur quelques articles ayant rapporté une telle approche (Grabowska *et al.*, 2000 ; de la Cruz, Lal et McCutchan, 1988 ; Meola *et al.*, 1995 ; Bastien, Trudel et Simard, 1997; Galfre *et al.*, 1996). Toutefois, aucun de ces protocoles ne concernant l'immunisation de rats avec un phage présentant un épitope par la protéine pIII, les conditions choisies ont donc été adaptées en conséquence. La dose de 1×10^{12} phages du mélange du pool I ainsi que l'inoculation intrapéritonéale de la suspension immunogène en absence d'adjuvant a été notre première approche. Le criblage des surnageants d'hybridomes a été effectué avec un mélange de phages (pool I) contenant les phages ET1, EC1, FT, FC, HT, HC et 2AT en parallèle avec le phage V. Dans le cas des fusions effectuées avec des cellules spléniques de rat ayant reçu des injections de rappel avec le phage portant la séquence du récepteur NKG2A, le criblage a été fait avec le phage 2AT en parallèle avec le phage V (Tableau VIII).

4.2.1 Analyse des séra

Les sera ont d'abord été analysés par cytométrie en flux avec des cellules LAK (Figure 10). Des tests sur les séra pré-immuns et immuns des rats F4 et F5 ont ensuite été effectués par ELISA. Les sera pré-immuns n'ont pas montré de réactivité avec les phages du pool I ni avec le phage V. Les sera immuns prélevés 10 jours après la première

immunisation (F4 et F5) et 10 jours après le premier rappel (F4), ont réagi autant contre le phage V que le pool I. Une telle réactivité était à prévoir car les analyses précédentes de séra prélevés des rats immunisés avec des cellules LAK avaient donné des résultats semblables. Aucune réactivité avec les phages recombinants n'a été décelée avec les séra immuns du rat DA-3.

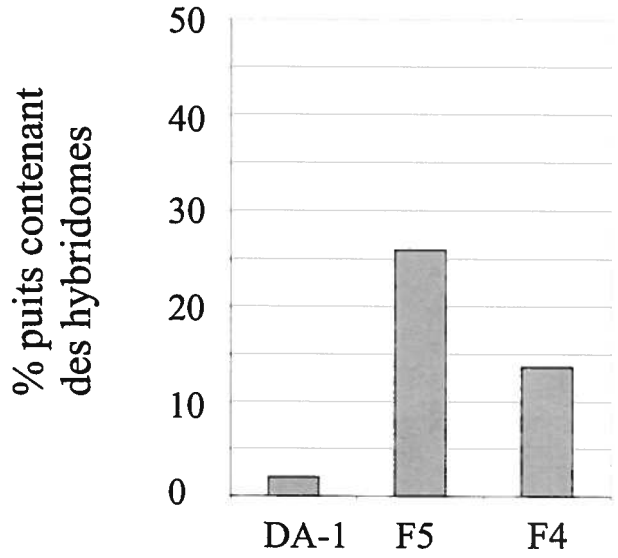
Il est à noter qu'avant de procéder à la fusion avec les cellules spléniques du rat F4, le sérum pré-immun et les séra immuns prélevés après le second et le troisième rappel (phage 2AT) ont subi quatre étapes d'absorption avec le phage V dans le but de savoir si les séra contenait des Ig contre l'épitope 2AT. Cette étape devait en théorie éliminer du sérum tous les anticorps dirigés contre le phage. Pour confirmer l'efficacité des absorptions, un test ELISA a été fait, et les séra non-absorbés et absorbés ont été testés contre le phage V et le phage 2AT. Les séra immuns non-absorbés ont montré une réactivité avec les deux phages. Le sérum pré-immun absorbé n'a montré aucune réactivité ni avec le phage V, ni avec le phage 2AT. Cependant, le sérum immun absorbé après le troisième rappel réagissait encore contre le phage V et le phage 2AT. Ce rat a tout de même été utilisé après les rats DA-3 et F5.

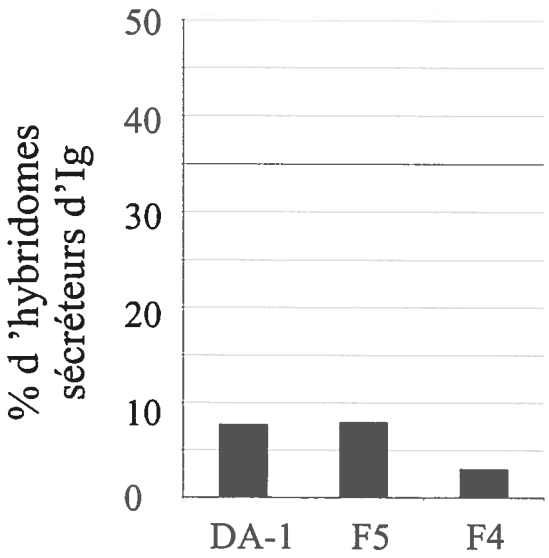
4.2.2 Fusions et criblage des surnageants d'hybridomes

Le rat DA-3 qui avait déjà reçu 3 immunisations avec des cellules LAK a reçu une seule injection de 1×10^{12} phages du pool I (Tableau V). Ce rat étant déjà âgé, la concentration d'ensemencement a été ajustée à 1×10^{6} cellules/ml pour réduire les risques de croissance des fibroblastes mais un plus grand nombre de plaques ont été préparées. Les résultats obtenus restent en dessous des valeurs attendues. Il n'y a eu que 2% d'hybridomes dans les plaques de fusion, car sur les 1440 puits ensemencés, 38 seulement avaient des hybridomes (Tableau X). Le pourcentage de puits sécréteurs d'Ig n'a été que 8%, c'est-à-dire que seulement 4 puits sur 29 puits testés sécrétaient des Ac, mais aucun n'a réagit spécifiquement avec les phages. Les analyses ont donc été arrêtées au bout d'une vingtaine de jours de culture. Il est à noter qu'au cours de cette fusion, de la contamination pas des moisissures est apparue dans les plaques de façon aléatoire et

Tableau X. Rendements obtenus pour les fusions impliquant les rats immunisés à la fois avec des cellules LAK et des phages.

Fusion	Nombre de puits ensemencés	Puits avec des hybridomes	Puits testés	Hybridomes sécréteurs d'Ac	Hybridomes spécifiques aux phages
DA-3 (18/09/00)	1440	38	29	4	0
F5 (08/12/00)	864	252	224	21	0
F4 (25/05/01)	960	131	87	3	0





sporadique, ce qui fait en sorte que ce n'est pas la totalité des puits ayant des hybridomes qui ont été criblés.

Un autre rat immunisé d'abord avec des cellules LAK, a reçu quelques injections de rappel avec un mélange de phages, mais l'ensemencement des plaques de fusion avec les cellules spléniques fusionnées avec les cellules myélomateuses a été fait par erreur à une concentration beaucoup trop faible (1 x 10^5 cellules/ml). Par conséquent, très peu de puits présentant une croissance d'hybridomes ont pu être observée. Par la suite, nous avons pensé continuer dans la même direction mais en raffinant la méthode, c'est-à-dire en injectant un seul phage pour la ou les immunisations de rappel.

Le rat F5, immunisé une seule fois avec des cellules LAK a reçu une injection de rappel avec un seul phage, le phage 2AT (1 x 10^{12} phages) (Tableau IV). Nous avons choisi le phage contenant la séquence du récepteur NKG2A car l'étude de Takei avait révélé la présence d'ARNm de ce récepteur sur 35% des cellules NK (Takei *et al.*, 2001), ce pourcentage étant plus élevé que pour les récepteurs Ly49E, Ly49F ou Ly49H. De plus, la séquence de ce phage contenant 7 acides aminés sur 8 uniques à leurs positions par rapport aux autres molécules NKG2, elle représentait une cible de choix pour la production d'un AcMo. Cette stratégie permettait donc de valider la méthode. L'apparition des premiers hybridomes est survenue au jour 9 après la fusion et le pourcentage d'hybridome a été de 26%, soit 252 puits avec des hybridomes sur les 864 ensemencés (Tableau X). Deux cent vingt quatre puits ont été testés en ELISA et 21 puits ont été sécréteurs d'anticorps ce qui fait que le pourcentage d'hybridomes n'a été que de 8%. Le criblage a été effectué avec seulement deux phages soit les phages 2AT et le phage V. Une réactivité avec le phage 2AT mais non avec le phage V aurait été l'indice que le surnageant du puits concerné réagissait avec l'épitope inséré et non avec les protéines structurales du phage. Sur les 224 surnageants testés, aucun n'a présenté une spécificité nette pour le phage 2AT, sans réagir avec le phage V. Cependant, deux surnageants d'hybridomes sécréteurs d'Ac ont montré une réactivité maintenue au cours des tests, avec les deux phages. Ceci implique qu'il y a bel et bien eu une réponse contre

le phage, mais vraisemblablement dirigée contre une protéine de capside et non contre l'épitope.

L'immunisation avec les phages n'a pas donné les résultats escomptés lors de la fusion DA-3. Mais, étant donné que lors de la fusion F5 des Ac ont probablement été générés contre la particule phagique, mais malheureusement pas contre l'épitope désiré, l'approche n'a pas été abandonnée. Afin de permettre une meilleure présentation de l'épitope, une meilleure dissémination de l'immunogène et une réponse en anticorps plus forte, un adjuvant de type TiterMaxGold a été injecté à deux reprises en combinaison avec le phage 2AT. Cet adjuvant est une huile métabolisable, le squalène. L'ingrédient actif est un copolymère synthétique accroché à la surface de particules de silice. Ces microparticules qui enrobent le copolymère agissent comme stabilisateur pour l'émulsion de l'huile dans l'eau. Le TiterMaxGold contient aussi un surfactant. Pour une bonne réponse immunitaire, un ratio de 50 :50 (adjuvant : antigène) est optimal, ce qui a été respecté. L'utilisation d'un adjuvant similaire a d'ailleurs permis d'augmenter la réponse de lapins immunisés avec un épitope couplé à la protéine pIII du phage fUSE5 (Lussier, 1997). La dernière injection de rappel a été faite par voie intrapéritonéale avec le phage 2AT sans adjuvant (Tableau V).

Malheureusement, cette approche n'a pas été plus efficace que les précédentes. Le pourcentage d'hybridomes n'a été que de 13%, c'est-à-dire que des hybridomes ont été détectés dans 131 puits sur les 960 ensemencés (Tableau X). Quatre vingt sept puits ont été testés par ELISA, et seulement 3 hybridomes se sont avérés sécréteurs d'anticorps. Le pourcentage des puits sécréteurs a donc été un des plus bas (3,4%). Les tests de spécificité contre le phage 2AT n'ont pas donné la réactivité escomptée, aucun surnageant d'hybridomes sur les 87 testés n'ayant réagi positivement.

En résumé, sauf pour la fusion F5, de faibles rendements de détection d'hybridomes ont été obtenus. Une contamination par les moisissures a affecté la croissance des hybridomes dans une fusion et par conséquent le nombre de surnageants d'hybridomes testés. Finalement, lors de la fusion F5 nous avons été en mesure de

détecter une réactivité avec le phage, mais non contre l'épitope ciblé du récepteur NKG2A.

4.3 Utilisation des thymocytes fœtaux en tant qu'immunogènes

Quelques articles avaient rapporté la présence dans des thymocytes fœtaux de transcrits d'ARNm, pour le récepteur Ly49E et non pour les autres récepteurs Ly49 (Toomey *et al.*, 1998; Van Beneden *et al.*, 1999). Ces cellules semblaient donc bien intéressantes pour la production d'un réactif spécifique contre le récepteur Ly49E. Par ailleurs, la présence de transcrits pour l'hétérodimère CD94/NKG2A avait aussi été rapportée dans des cellules NK murines dérivées du thymus fœtal (Sivakumar *et al.*, 1999). Même en portant à leur surface une foule d'autres récepteurs non apparentés aux familles de récepteurs Ly49 et NKG2, les cellules thymiques fœtales demeuraient une alternative attrayante pour diminuer la compétition antigénique avec les autres récepteurs Ly49. L'utilisation de thymocytes fœtaux comme immunogène permettait de viser non seulement le récepteur Ly49E, mais également le récepteur CD94/NKG2A. Afin d'assurer un criblage plus complet, trois nouveaux phages (ET2, EC2 et EC3) ciblant la portion extracellulaire du récepteur Ly49E ont été générés. Les phages exprimant les 5 séquences du récepteur Ly49E (ET1, ET2, EC1, EC2 et EC3) ainsi que chacune des séquences pour l'hétérodimère CD94/NKG2A (CD94 et 2AT) ont été utilisés lors du criblage des surnageants d'hybridomes. Le phage V a servi de témoin négatif.

4.3.1 Analyse cytofluorométrique

Utilisant des thymocytes fœtaux de 17 jours de gestation cultivés en présence d'IL-2 comme immunogènes, une équipe belge a réussi à générer un nouvel anticorps anti-Ly49 appelé 4D12 (Van Beneden *et al.*, 2001). Lors de l'analyse de spécificité avec des cellules transfectées avec plusieurs récepteurs Ly49, 4D12 a réagi autant avec les cellules $Ly49E^+$ que les cellules $Ly49C^+$ (Van Beneden *et al.*, 2001). Nous avons mentionnés précédemment que l'AcMo 4LO3311, produit par notre laboratoire, réagit

exclusivement avec le récepteur Ly49C. L'utilisation de ces deux anticorps en combinaison permet de rechercher la présence des cellules $Ly49E^{+}Ly49C^{-}$.

Un échange de réactifs avec le laboratoire de Van Beneden nous a permis d'obtenir l'AcMo 4D12 (anti-Ly49E et C). Avant d'utiliser ce réactif avec des thymocytes fœtaux, nous avons évalué sa réactivité avec des cellules NK et LAK. Nos animaux ayant d'abord été immunisés avec des cellules LAK, il était intéressant d'évaluer si les rats avaient rencontré le récepteur Ly49E lors de la première immunisation. En utilisant l'Ac 4D12 en combinaison avec l'AcMo 4LO3311 (anti-Ly49C), la proportion de cellules positives pour le récepteur Ly49E a pu être déterminée par des analyses de cytométrie en flux. Dans les expériences réalisées sur des cellules NK fraîches (Figure 11) on voit que 28% des cellules réagissent avec 4D12 mais que la majorité des cellules réagissent également avec 4LO3311. L'anticorps 4D12 réagissant avec les deux récepteurs, on ne peut dire si les cellules du quadrant supérieur droit sont $Ly49E^{+}$ $Ly49C^{-}$ ou simplement $Ly49C^{+}$. Cependant, avec des cellules LAK cultivées 5 jours en présence d'IL-2, le pourcentage de cellules $Ly49E^{+}$ $Ly49C^{-}$ a grimpé à 14,4% (Figure 11). Ces résultats nous permettent de croire que le récepteur Ly49E était bel et bien exprimé à la surface des cellules LAK lors des immunisations précédentes.

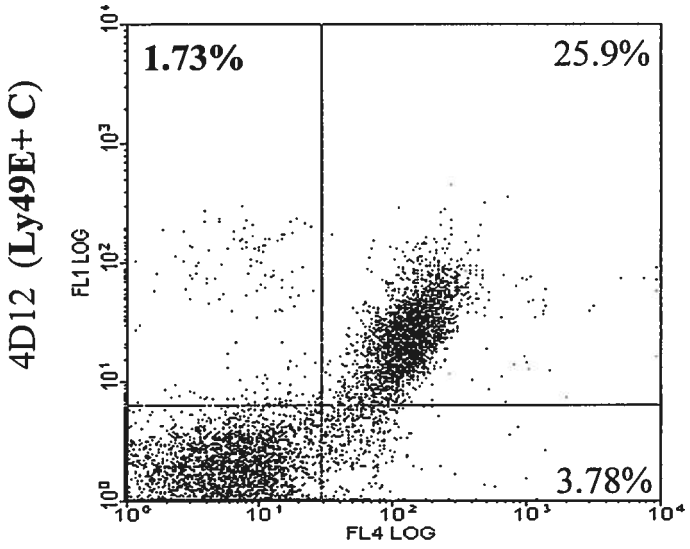
Des souris B6 d'élevage ont été accouplées afin d'obtenir des femelles gestantes, desquelles il était possible d'isoler le thymus des fœtus. Sur l'ensemble des femelles qui ont été mises dans les conditions d'accouplement, seulement 10 sur les 101 ont été gravides, ce qui donne un rendement d'environ 10%. Si nous regardons le taux de succès des accouplements, seulement 5 accouplements sur les 10 mis en route, ont généré des femelles gestantes. Ceci a fait en sorte que les expériences ont d'une part été retardées, et seulement deux fusions impliquant les rats immunisés avec des thymocytes fœtaux ont pu être réalisées.

Étant donné que l'AcMo 4D12 avait été produit en utilisant des thymocytes fœtaux de 17 jours, nous avons isolé à notre tour ces cellules et procédé à la mise en culture. Une

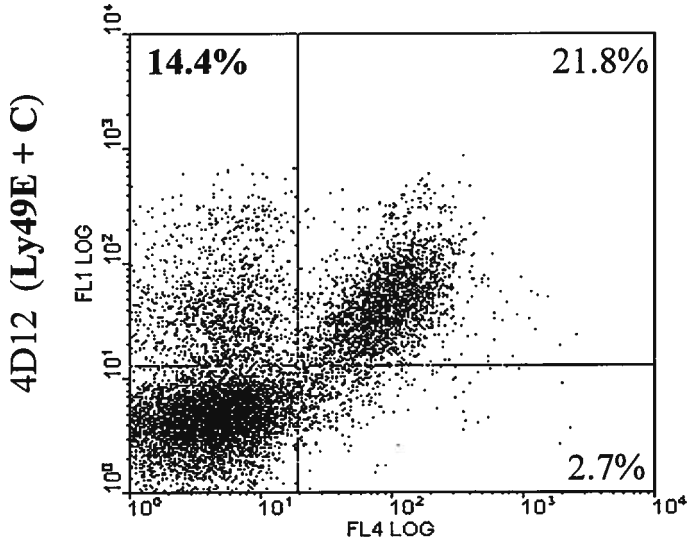
Figure 11. Détermination, par cytométrie en flux, de la proportion des cellules NK et LAK réagissant avec les anticorps 4D12 (anti-Ly49E et C) et 4LO3311 (anti-Ly49C).

L'histogramme du haut représente l'analyse effectuée avec des cellules NK tandis que celui du bas représente l'analyse effectuée sur des cellules LAK cultivées 9 jours en présence d'IL-2. Le quadrant supérieur gauche indique les cellules $Ly49E^{+}Ly49C^{-}$. Le quadrant supérieur droit indique les cellules $Ly49E^{+}Ly49C^{+}$ ou $Ly49C^{+}$. Le quadrant inférieur droit indique les cellules $Ly49E^{-}Ly49C^{+}$ tandis que le quadrant inférieur gauche montre les cellules double négative. L'anticorps 4D12 est couplé au FITC tandis que l'anticorps 4LO3311 est couplé à la biotine et les cellules positives pour ce marqueur sont révélées par l'ajout du conjugué SA-Red670.

NK


1.73%
25.9%
3.78%
4D12 (Ly49E+ C)
FL1 LOG
FL4 LOG
4LO3311 (Ly49C)

LAK


14.4%
21.8%
2.7%
4D12 (Ly49E + C)
FL1 LOG
FL4 LOG
4LO3311 (Ly49C)

moyenne de 1,6 millions de cellules par thymus a été obtenue. Avec un si grand nombre de cellules, l'immunisation immédiate a été envisagée, mais encore fallait-il s'assurer de la présence du récepteur Ly49E. Des tests de cytométrie en flux ont permis de voir que l'anticorps 4D12 était en mesure de marquer moins de 1% des cellules fraîches (Figure 12). Les thymocytes fœtaux ont par la suite été mis en culture. La culture des thymocytes, à une concentration de 1 x 10^6 cellules/ml a été effectuée dans plusieurs conditions. Une partie (1) des thymocytes a été cultivée avec de l'IL-2 (1000 U/ml), une autre (2) avec de l'IL-4 (10 U/ml) et du PMA (10 ηg/ml) et la dernière partie des thymocytes (3) a été cultivée avec une combinaison d'IL-2, d'IL-4 et de PMA dans les mêmes concentrations. Les thymocytes cultivés dans les conditions 2 ont montré un taux élevé de mortalité dans les premiers jours, par la suite leur prolifération a été beaucoup plus lente que pour les thymocytes cultivés dans les deux autres conditions. La prolifération des thymocytes fœtaux de 17 jours a été optimale lorsque le milieu de culture contenait seulement de l'IL-2, ces conditions ont été conservées pour les expériences suivantes.

Les thymocytes cultivés en présence d'IL-2 ont été analysés en cytométrie en flux. Après 3 jours de culture, le pourcentage de cellules $4D12^+$ avait grimpé à 16%, alors que l'expression du récepteur Ly49C est demeurée négligeable (résultat non-illustré). Après 5 jours en culture, l'anticorps 4D12 a marqué 17% des thymocytes, la majorité étant des cellules $Ly49E^+Ly49C^-$ (Figure 12). Moins de 5% des thymocytes fœtaux expriment le récepteur Ly49C. Ces cellules constituaient donc un bon immunogène puisqu'elles expriment le récepteur Ly49E dans une proportion acceptable et n'expriment pas ou peu le récepteur Ly49C. Des thymocytes fœtaux de 17 jours cultivés 6 à 7 jours en présence d'IL-2 ont servi aux immunisations des rats F6 et F7.

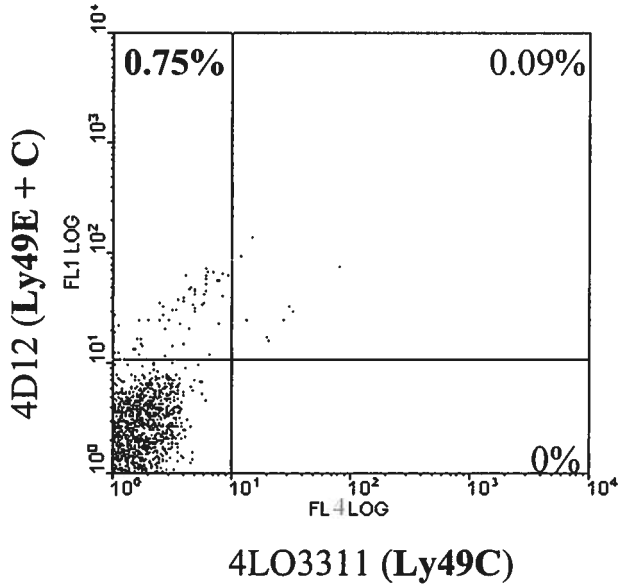
4.3.2 Analyse des séra

L'analyse des séra par cytométrie en flux n'a pu être effectué sur des thymocytes fœtaux étant donné que la totalité des thymocytes a été utilisée pour les injections. Les séra des rats F6 et F7 ont tout de même été testés par cytométrie en flux pour leur réactivité avec des cellules LAK. L'intensité moyenne de fluorescence a été déplacée de

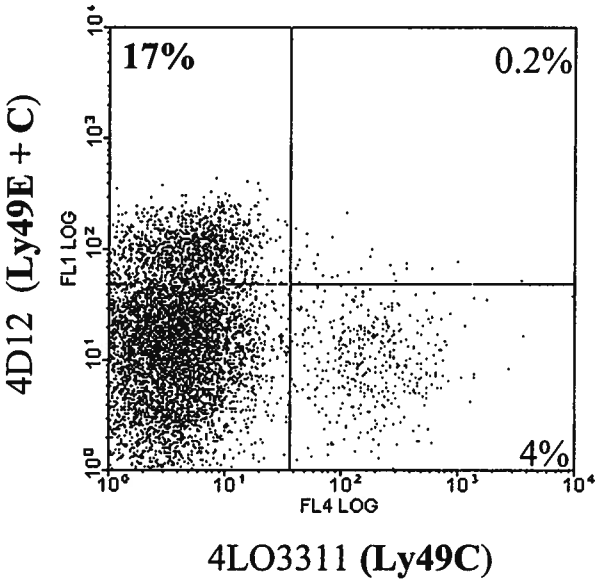
Figure 12. Détermination, par cytométrie en flux, de la proportion de thymocytes fœtaux exprimant le récepteur Ly49E.

L'histogramme du haut correspond à l'analyse effectuée sur des thymocytes fœtaux de 17 jours de gestation. Le récepteur Ly49C, marqué avec l'anticorps 4LO3311, n'est pas exprimé dans cette population. Moins de 1% des cellules sont $Ly49E^{+}Ly49C^{-}$. En bas, après culture de 5 jours en présence d'IL-2 des thymocytes fœtaux, la proportion de cellules $4D12^{+}4LO3311^{-}$ atteint 17%. L'expression du récepteur Ly49C, sur les thymocytes fœtaux cultivés reste négligeable.

Frais



Cultivées



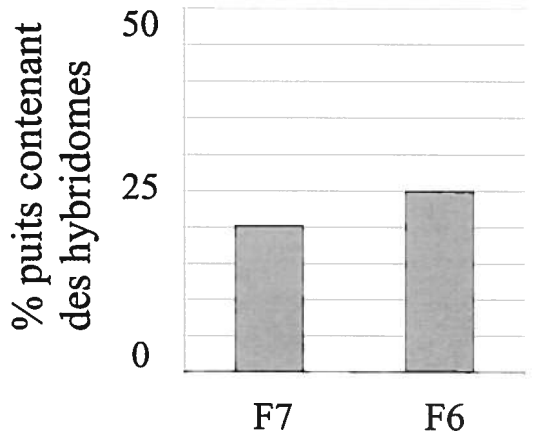
façon très nette par rapport au sérum pré-immun (résultat non-illustré) indiquant que les animaux avaient sûrement réagi aux immunisations. Pour leur part, les tests ELISA sur les séra immuns ont montré une réactivité avec les phages V, 2AT et le pool II contenant les phages recombinants exprimant les 5 séquences du récepteur Ly49E. Cette réactivité non-spécifique suggérait que le rat pouvait avoir réagi avec un constituant des thymocytes fœtaux ayant une séquence commune avec une protéine de la capside phagique.

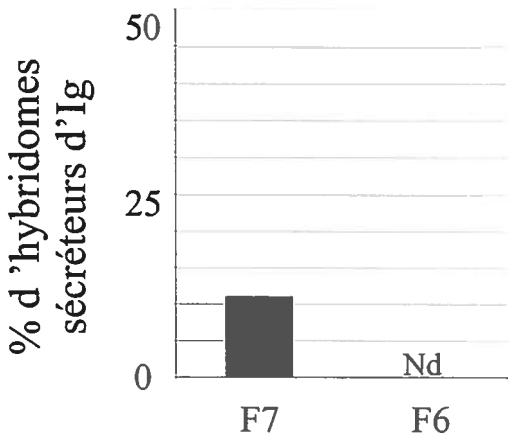
4.3.3 Fusions et criblage des surnageants d'hybridomes

Pour la fusion F7, le pourcentage d'hybridomes a été de 20%, c'est-à-dire qu'il y a eu 175 puits avec des hybridomes sur les 864 ensemencés (Tableau XI). Cent seize puits ont été testé et une production d'Ac n'a été détectée que dans 17 de ces puits, pour un rendement de 11%. Aucun des surnageants sécréteurs d'Ig n'a montré de réactivité, ni contre le mélange de phages recombinants exprimant les séquences du récepteur Ly49E, ni contre les phages CD94 et 2AT, ni contre le témoin négatif phage V. Les hybridomes ont été maintenus sur une période de 4 à 5 semaines. À la fusion F6, 25% des puits ont montré une croissance d'hybridomes. Ce pourcentage correspond tout de même à la limite inférieure du pourcentage attendu. Pour cette fusion, tous les puits montrant une croissance d'hybridomes supérieure à 25% ont été testés directement avec le mélange de phages (pool II). Aucun des 240 puits testés n'a montré de réactivité avec les phages recombinants. En résumé, sur les 356 puits testés, dans les fusions effectuées avec des cellules spléniques de rats immunisés avec des cellules thymiques fœtales, le système de criblage n'a pas été en mesure de retenir une Ig spécifique du récepteur Ly49E ou de l'hétérodimère CD94/NKG2A.

Tableau XI. Rendements obtenus pour les fusions impliquant les rats immunisés avec des thymocytes fœtaux.

Fusion	Nombre de puits ensemencés	Puits avec des hybridomes	Puits testés	Hybridomes sécréteurs d'Ac	Hybridomes spécifiques aux phages
F7 (27/04/01)	864	175	116	17	0
F6 (26/07/01)	960	240	240	Nd	0





DISCUSSION

Des 10 récepteurs Ly49 exprimés chez la souris B6, les récepteurs Ly49A, C, D, G ont été particulièrement bien caractérisés, notamment grâce à la disponibilité d'AcMo. Ceux-ci ont permis entre autres de connaître la distribution cellulaire et génétique ainsi que l'activité fonctionnelle de ces récepteurs. Au début de mon projet de maîtrise, les récepteurs Ly49B, E, F, H, I et J étaient moins bien connus, principalement parce qu'aucun Ac réagissant spécifiquement avec un seul d'entre eux n'était disponible. Le récepteur Ly49B a fait l'objet d'un mémoire par une autre étudiante du laboratoire (Lévesque, 2001). Les récepteurs Ly49E, F, H I et J font tous partie du groupe de récepteurs apparentés à Ly49C auquel sont aussi associés les récepteurs Ly49S et Ly49U exprimés chez la souris 129/J, mais non chez la souris B6 (Makrigiannis *et al.*, 1999; Takei *et al.*, 2001). Outre les récepteurs Ly49S et Ly49U, les récepteurs Ly49I et J ont été exclus de notre étude qui concernait seulement des récepteurs Ly49 exprimés chez la souris B6. L'homologie en nucléotides des récepteurs Ly49I et Ly49J, entre eux et par rapport à Ly49C, est de l'ordre de 96% (Tableau I). Cette forte homologie rend difficile la production d'un réactif spécifique à un seul récepteur. Pour preuve, 3 des 4 AcMo qui réagissent avec Ly49I soit SW5E6 (Sentman *et al.*, 1989), 5GA5 (Depatie *et al.*, 1999) et 14B11 (Corral *et al.*, 1999) ont une réactivité croisée avec Ly49C et le quatrième, 8H7, réagit avec Ly49J (McQueen *et al.*, 1999). 14B11 réagit aussi avec les récepteurs Ly49F et Ly49H. Outre sa grande homologie avec Ly49C et Ly49I, le récepteur Ly49J n'est exprimé que sur 5 à 8% des cellules NK (Kubota *et al.*, 1999), une difficulté supplémentaire en vue de la production d'un AcMo. En raison de la moins grande homologie des récepteurs entre eux et par rapport à Ly49C, la production d'AcMo contre les récepteurs Ly49E, Ly49F et Ly49H semblait plus réalisable que contre les récepteurs Ly49I et Ly49J. Leur homologie par rapport à Ly49C est d'environ 90% et il y a de 85 à 91% d'homologie entre ces 3 récepteurs (Tableau I). Le récepteur CD94/NKG2A a été inclus dans l'étude afin de valider l'approche choisie. Alors que les récepteurs Ly49E, Ly49F et Ly49H sont exprimés sur des populations de petite taille, le récepteur CD94/NKG2A se retrouve à la surface de 35% des cellules NK adultes. La fréquence des cellules exprimant ce récepteur et la présence dans sa séquence d'un motif cible

caractérisé par un enchaînement unique de 7 acides aminés non trouvés dans aucune autre molécule NKG2 ou Ly49 en faisait un récepteur de choix pour démontrer la possibilité de sélectionner un anticorps contre un motif précis en utilisant des phages recombinants. Le but du projet était donc de générer des AcMo capables de reconnaître des séquences uniques aux récepteurs Ly49E, F, H et CD94/NKG2A. L'originalité de l'approche que nous avons choisie vient du fait que nous recherchions des Ac d'une spécificité prédéfinie à l'aide de phages recombinants exprimant des épitopes précis de chacun de ces récepteurs.

Le défi était de taille pour plusieurs raisons. D'une part, les récepteurs d'intérêt sont exprimés sur une faible proportion de cellules NK par rapport aux récepteurs Ly49A (15 à 20%), Ly49C (25 à 30%), Ly49D (50%) et Ly49G2 (40%). Puisque les populations qui expriment ces récepteurs sont largement représentées, il a été plus facile de produire des anticorps contre ces derniers. La plupart des anticorps dirigés contre ces récepteurs ont été produits en immunisant des animaux avec des cellules spléniques. Par contre, puisque la population qui exprime Ly49A est de petite taille, les trois anticorps disponibles, A1, YE1/32 et YE1/48, ont dû être générés en immunisant des souris avec des cellules tumorales EL-4 induites ou avec croisement de cellules EL-4 induites avec des cellules de rate de souris AKR stimulées à la ConA; les deux types de cellules expriment Ly49A (Nagasawa *et al.*, 1987; Chan et Takei, 1988). D'autre part, le niveau d'homologie est supérieur à 85% dans le groupe apparenté au récepteur Ly49C. Nous cherchions donc à produire des réactifs contre des molécules très semblables. C'est pourquoi parmi les inserts déterminés, il y avait rareté de séquences contenant plus d'un acide aminé unique à un récepteur Ly49 ce qui représentait une difficulté supplémentaire.

Les hybridomes les plus intéressants sont ceux qui produisent des anticorps capables de bloquer les interactions récepteur/ligand. Dans le cas présent, les ligands des trois récepteurs Ly49 concernés par ce projet ne sont pas connus. Les domaines de liaison du récepteur Ly49A avec le ligand H-2D^d ont été localisés au niveau du domaine CRD (Tormo *et al.*, 1999). Par ailleurs, la situation est différente pour le récepteur Ly49C pour lequel il a été démontré que la tige et le CRD sont impliqués dans la liaison avec le ligand

H-2K^b (Brennan *et al.*, 1996b) Ceci a été établi en démontrant que des anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes localisés dans ces deux régions pouvaient interférer dans l'attachement des cellules transfectées avec l'ADNc de Ly49C à des cellules cibles H-2^b. À ce jour, l'AcMo 4LO3311 est le seul anticorps reconnaissant un épitope dans la tige qui interfère dans la liaison avec son ligand. Les récepteurs Ly49E, Ly49F et Ly49H font partie d'un même groupe d'homologie que Ly49C (Takei *et al.*, 2001). De tous les récepteurs de ce groupe exprimés chez B6, Ly49H est le seul à ne pas avoir d'ITIM dans sa portion cytoplasmique, il est par ailleurs étonnant que tous les autres récepteurs du groupe apparenté à Ly49C aient à la fois un motif ITIM dans leur portion cytoplasmique et un acide aminé chargé dans leur domaine transmembranaire, cette particularité étant généralement une propriété des récepteurs d'activation qui doivent s'associer à une molécule adaptatrice pour pouvoir transmettre un signal. Le rôle du résidu chargé du domaine transmembranaire des récepteurs Ly49 à ITIM n'a pas encore été exploré. L'homologie structurale pourrait bien se traduire par une réactivité de même nature avec un ligand. Or, Ly49C étant pour l'instant le seul récepteur Ly49 pour lequel l'implication de la tige dans la liaison à un ligand a été démontrée, il nous paraissait intéressant de chercher à établir si tel était aussi le cas pour d'autres récepteurs du même groupe. Nous avons donc tenté d'identifier des motifs uniques dans la tige et le CRD des récepteurs Ly49 contre lesquels nous souhaitions produire des anticorps. Advenant que des ligands des récepteurs Ly49E, F et H soient ultérieurement identifiés, la disponibilité d'AcMo contre des épitopes localisés dans deux régions différentes du domaine extracellulaire de ces récepteurs nous aurait permis d'évaluer si la contribution de la tige et du CRD dans la liaison à un ligand était ou non une propriété exclusive au récepteur Ly49C.

Les séquences cibles sélectionnées constituent la base du système de criblage que nous avons défini et qui a impliqué la production de phages recombinants. La technologie du « phage display » est une approche méthodologique dont l'usage est en expansion, du fait de ses nombreuses applications. Elle utilise des phages filamenteux pouvant présenter à leur surface des protéines, des peptides aléatoires ou définis, des fragments d'Ac etc. Nous avons exploité la capacité du phage filamenteux à exprimer à sa surface un peptide

d'intérêt inséré au niveau de la protéine pIII. En fait, les oligonucléotides ciblés peuvent être introduits près de l'extrémité aminoterminale de la protéine pIII tout en n'interférant pas avec l'assemblage des composantes du phage (Parmley et Smith 1988). Fait intéressant, l'ADN inséré (les oligonucléotides) est intégré de façon stable dans le génome tout en conservant l'infectivité du phage. La purification des phages est simple étant donné qu'ils sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. L'amplification de tous les phages a permis de récupérer entre 4,5 x 10^{13} et 3,15 x 10^{14} phages/ml. La facilité de production des phages permet ainsi de renouveler la banque aisément.

Le système de criblage choisi avait aussi comme avantage de pouvoir théoriquement dépister rapidement plusieurs hybridomes produisant des anticorps de spécificités prédéterminées. Par ailleurs, la comparaison avec l'analyse par cristallographie du récepteur Ly49A (Tormo *et al.*, 1999), nous a permis de vérifier l'exposition hypothétique des épitopes choisis. Même si la configuration spatiale de Ly49A n'est sûrement pas exactement comme celle des récepteurs visés, la cristallographie pouvait néanmoins donner une bonne idée des sites exposés. La plupart des séquences sélectionnées étaient théoriquement situées dans des boucles bien exposées. Cependant, étant donné que nous recherchions des Ac d'une spécificité bien précise en utilisant un système de criblage très sélectif, et que l'immunisation se faisait avec une « soupe » d'antigènes, il fallait prévoir trouver très peu de puits correspondant à nos attentes. De plus, les phages recombinants que nous avons produits avaient le désavantage majeur de ne dépister que les anticorps reconnaissant des épitopes linéaires. Nous étions conscients que si des résidus des séquences cibles participaient à la constitution d'un épitope conformationnel, nous avions peu de chance qu'un Ac produit contre celui-ci se lie aux phages recombinants exprimant cette séquence.

Un autre point important à souligner concerne la sensibilité du test de criblage. Lors de la mise du point, la sensibilité du test a été établie à 100 ηg/ml. Étant donné que dans un surnageant d'hybridomes on retrouve environ 1 à 15 μg/ml d'anticorps, nous étions certains d'être dans les conditions appropriées pour détecter la présence d'anticorps

qui seraient spécifiques à l'une ou l'autre des séquences exprimées dans les phages recombinants du mélange.

L'immunisation avec les cellules totales pouvait sembler risquée à prime abord. En effet, les cellules NK/LAK sont une population très hétérogène et une même cellule exprime plus d'un récepteur à la fois (Brennan *et al.*, 1994; Kubota *et al.*, 1999). Avec cette approche, plusieurs récepteurs étaient visés et il était clair que la compétition antigénique était très forte. Cependant, un certain nombre d'équipes de recherche ont tout de même réussi à produire de cette façon des Ac contre des récepteurs Ly49. Par exemple, c'est en immunisant des souris 129/J avec des cellules LAK de B6 que l'AcMo SW5E6 (Ly49C/I) a pu être produit (Sentman *et al.*, 1989). De même, les AcMo 4LO3311 (Ly49C) et 4LO439 (Ly49G2) ont également été produit en immunisant des souris 129/Sv avec des cellules NK1.1$^+$ de B6 cultivées en présence d'IL-2 (Lemieux *et al.*, 1991). C'est aussi en immunisant des rats Fisher avec des cellules LGL (large granular lymphocyte) que l'Ac 4D11 (Ly49G2) a été produit (Mason *et al.*, 1988). C'est également en immunisant des hamsters arméniens avec des cellules spléniques LAK de souris BALB/c qu'une étudiante de notre laboratoire a pu générer l'anticorps 5GA5 (Ly49C/I) (Paré, 1995). Enfin, pour la production de l'Ac 14B11, des hamsters ont été immunisés 5 fois à 1 semaine d'intervalle avec des cellules LAK de B6. Par contre, ce sont les ganglions lymphatiques qui ont servi de source de cellules B activées à la place des cellules spléniques. Rappelons que 14B11 reconnaît les récepteurs Ly49I, C, F et H (Corral *et al.*, 1999). Étant donné que trois de ces Ac (4LO3311, 4LO439 et 5GA5) ont été générés dans notre laboratoire, nous avions alors une certaine expertise dans ce domaine. Donc, nous partions confiants qu'avec cette méthode, nous pouvions atteindre le but visé. Malheureusement, tel ne fut pas le cas et nous avons décidé de changer de stratégie d'immunisation.

Lorsque nous avons pensé utiliser les phages recombinants comme immunogène, nous savions déjà que plusieurs équipes s'étaient servies avec succès de phages recombinants pour immuniser des animaux contre des antigènes viraux et que des Ac pouvaient reconnaître le peptide étranger exprimé par ces phages. Dans tous les cas, les anticorps produits ont reconnu les antigènes sous leur forme native (Grabowska *et al.*,

2000; de la Cruz, Lal et McCutchan, 1988; Meola *et al.*, 1995; Bastien, Trudel et Simard, 1997). Nous savions par ailleurs que présenté dans le contexte de la protéine pIII d'un phage filamenteux, l'immunogène ne conservait pas la forme native du récepteur tel qu'exprimé sur des cellules. À titre de compromis, les animaux ont d'abord été immunisés avec des cellules LAK pour les sensibiliser avec la forme native des récepteurs et le ou les derniers rappels ont été faits avec un phage ou un groupe de phages. De cette façon, nous espérions induire une réponse secondaire contre le ou les épitopes visés. Cependant, parmi les peptides choisis, certains contiennent des sites de glycosylation internes ou adjacents à la séquence choisie. Nous étions conscient que cet état de fait était problématique, mais étant donné le nombre réduit de résidu unique à chacun des récepteurs (Tableau II), les choix de séquences cibles potentielles étaient restreints. De plus, en effectuant des rappels avec des phages recombinants, il fallait aussi s'attendre à ce que les protéines structurales des particules phagiques compétitionnent à leur tour avec les épitopes sélectionnés. La fusion F5 est un bon exemple de cette situation.

Le rat dont les cellules spléniques ont été utilisées pour cette fusion avait reçu une seule injection de sensibilisation avec les cellules LAK et une seule injection de rappel avec le phage 2AT (Tableau V). Les cellules spléniques ayant été prélevées trois jours après l'injection de rappel, nous avions émis l'hypothèse que si une réponse humorale était induite contre des protéines structurales du phage, il s'agirait vraisemblablement d'une réponse primaire qui ne devrait pas donné lieu à une production d'IgG dans un laps de temps aussi court et qui, par conséquent, ne devrait pas être détectée par le test ELISA. Pourtant, deux des surnageants d'hybridomes sécréteurs d'Ig issus de cette fusion ont montré une réactivité soutenue avec le phage 2AT mais également avec le phage V utilisé comme témoin négatif. Une réactivité semblable avait aussi été observée lors de l'analyse du sérum prélevé après l'immunisation avec des cellules LAK. L'explication la plus plausible est qu'il y aurait un épitope commun entre une protéine présente dans les cellules LAK et une protéine structurale du phage filamenteux, la première étant responsable de la sensibilisation du rat et la seconde ayant agi comme antigène de rappel. Les deux hybridomes sélectionnés sont donc malheureusement sans intérêt. Bien qu'un

hybridome producteur d'anticorps spécifiques anti-NKG2A n'ait pu être sélectionné dans le cadre de cette fusion, nous n'avons pas abandonné cette piste. Un second animal sensibilisé préalablement par deux injections de cellules LAK, a été soumis à trois injections de rappel avec les phages 2AT dont deux par voie intramusculaire en présence d'un adjuvant et une dernière par voie intrapéritonéale sans adjuvant. Le rendement en hybridomes ayant été extrêmement faible dans la fusion effectuée avec les cellules spléniques de cet animal, nos chances étaient quasi nulles d'identifier un hybridome producteur d'un anticorps de la spécificité désirée. L'efficacité du partenaire de fusion aurait pu être mise en doute mais étant donné que des fusions faites en parallèle dans notre laboratoire avec le même partenaire de fusion donnaient des rendements de l'ordre de ceux auxquels on pouvait s'attendre, nous avons plutôt opté pour l'exploration d'une troisième stratégie d'immunisation.

Pendant le projet, un nouvel Ac 4D12, ayant une double réactivité contre les récepteurs Ly49E et Ly49C, a été produit par un autre laboratoire en immunisant des rats avec des cellules thymiques fœtales (Van Beneden *et al.*, 2001). L'immunisation avec de telles cellules semblait efficace et elle avait l'avantage de conserver la forme native des récepteurs. Grâce à cet Ac, l'expression en surface du récepteur Ly49E notamment sur des cellules LAK a été prouvée. Malgré le fait que cet anticorps reconnaisse autant Ly49E que Ly49C, en utilisant à la fois des cellules transfectées avec l'ADNc de Ly49C et des thymocytes fœtaux de souris de 17 jours de gestation, l'équipe de Van Beneden a été en mesure de montrer que le récepteur Ly49E est une protéine homodimérique portant des sous-unités de 46 KDa. Le récepteur Ly49E en plus d'être présent sur 50% des thymocytes fœtaux de 17 jours, se retrouve également sur les cellules NKT et les cellules T mémoires. La phosphorylation sur tyrosine de l'ITIM du récepteur Ly49E sur des cellules NK thymiques fœtales suite à une stimulation au pervanadate, suggère un rôle d'inhibition (Van Beneden *et al.*, 2001). Puisque pour l'instant le seul anticorps reconnaissant uniquement le récepteur Ly49C est le réactif 4LO3311 que nous avons produit, il était intéressant d'utiliser l'AcMo 4D12 reconnaissant Ly49E et Ly49C en combinaison avec 4LO3311 pour des analyses phénotypiques. Un échange de réactifs

avec le laboratoire de Van Beneden nous a permis d'effectuer les analyses décrites précédemment.

Les résultats d'analyse cytofluorométrique que nous avons obtenus avec les thymocytes fœtaux de 17 jours sont différents de ceux obtenus par l'équipe de Van Beneden. Les expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire ont montré que le récepteur Ly49E était exprimé sur moins de 1% des thymocytes fœtaux frais et qu'il était exprimé sur 20% des thymocytes fœtaux en culture sans coexpression de Ly49C (Figure 12). Rappelons que de telles données ont été obtenues lors de plusieurs expériences et que ces dernières ont été effectuées sur les thymocytes totaux. L'équipe de Van Beneden a observé que le récepteur Ly49E était exprimé à au moins 50% sur les thymocytes fœtaux de 17 jours frais et en culture. Ces mesures ayant été faites sur la population de thymocytes fœtaux $CD3^-$ $NK1.1^+$, plutôt que sur les thymocytes totaux, une comparaison est donc difficile. Cependant, les mêmes expériences ont été reprises par nous avec la population $CD3^-NK1.1^+$, et ont permis d'observer que 8,3% des thymocytes frais expriment le récepteur Ly49E et qu'après la mise en culture, ce pourcentage n'est plus que de 4,9% (résultat non-illustré). Les divergences pourraient provenir du fait que les souris utilisées dans le cadre de nos expériences sont de souche américaine, tandis que les souris utilisées par l'équipe de Van Beneden proviennent de souches européennes. Des changements significatifs ont parfois été observés dans la filiation de souches pourtant dérivées d'un ancêtre commun. Bref, malgré que les résultats ne concordent pas sur toute la ligne, l'intérêt des thymocytes fœtaux pour l'immunisation réside dans le fait qu'ils montrent une proportion plus élevée de cellules exprimant le récepteur Ly49E que les cellules LAK. De plus, la compétition avec les autres récepteurs Ly49 s'en trouvait diminuée puisque les thymocytes fœtaux n'expriment pas d'autres récepteurs Ly49, tel que vérifié pour Ly49C, Ly49G et Ly49A (résultats non-illustrés). Ces cellules constituaient donc un immunogène de choix afin de cibler plus particulièrement le récepteur Ly49E. L'utilisation des thymocytes fœtaux permettait également de cibler le récepteur CD94/NKG2A, dont l'expression en surface cellulaire a été rapportée par d'autres équipes (Vance, Jamieson et Raulet, 1999; Van Beneden et al., 2001), mais qui

n'a pu être vérifiée dans nos conditions puisque nous n'avions pas à notre disposition d'anticorps réagissant avec ce récepteur.

Dû aux nombreuses difficultés auxquelles nous avons fait face lors des accouplements, seulement deux fusions ont pu être effectuées en utilisant des animaux immunisés avec des thymocytes fœtaux de 17 jours de gestation. Comme pour la majorité des fusions précédentes, les rendements en hybridomes ont été très faibles.

De façon générale, dans plusieurs fusions la contamination par les moisissures a envahi certaines plaques. Cette contamination a certainement altéré la croissance des hybridomes. Ce ne sont donc pas tous les puits contenant des hybridomes confluents qui ont été criblés. Cette diminution du nombre de puits testés a réduit les probabilités de tomber sur le ou les puits intéressants. Il est à noter que même lors des fusions dans lesquelles il n'y a pas eu de contamination par des moisissures, de faibles rendements en hybridomes ont été observés. Pour les 8 fusions effectuées, peu d'hybridomes ont été obtenus et la majorité ne sécrétaient pas d'Ig. Pourtant, les protocoles d'immunisation ne sont pas à incriminer puisque les animaux ont répondu d'une façon ou d'une autre aux immunogènes inoculés (Figure 10 et résultats non-illustrés). Il n'existe pas de méthode universelle d'immunisation pour la production d'hybridomes. Plusieurs protocoles ont été publiés et leur diversité reflète les difficultés à trouver celui qui soit le meilleur. L'hypothèse la plus probable pouvant expliquer ces rendements est que l'utilisation d'un partenaire de fusion provenant d'une autre espèce, a pu générer des hétérohybridomes rat-souris instables. Si les hybridomes résultants sont plus fragiles, la sécrétion d'Ig s'en trouve également affectée. Par ailleurs, la fréquence d'hybridomes requise pour obtenir un anticorps monoclonal contre un épitope au hasard d'une protéine donnée est de l'ordre de moins de 2%. Le degré de difficulté était encore plus élevé avec la recherche d'un anticorps d'une spécificité prédéterminée.

Durant la période de réalisation du projet, quelques nouveaux anticorps monoclonaux ont été générés par d'autres laboratoires contre les récepteurs que nous avions ciblés (Figure 13). L'équipe de Coles a tout d'abord généré l'anticorps HBF-719,

Figure 13. État actuel de la situation concernant tous les anticorps dirigés contre des récepteurs apparentés à Ly49C.

Les anticorps en gras sont ceux ayant été produits durant la période de réalisation du projet. Les références correspondent aux travaux ayant rapporté l'étude de spécificité; c'est parfois une autre équipe qui a produit l'anticorps.

AcMo	Ly49C	J	I	F	H	E	
SW5E6	+	-	+	-	-	-	Kumar *et al.* 1996*b*
4LO3311	**+**	-	-	-	-	-	Gosselin *et al.* 1997
5GA5	+	?	+	-	-	-	Depatie *et al.* 1999
8H7	-	+	+	-	-	-	McQueen *et al.* 1999
14B11	+	-	+	+	+	-	Corral *et al.* 1999
3D10	-	?	+	-	+	-	Smith *et al.* 2000
HBF-719	-	?	-	+	-	-	Coles *et al.* 2000
1F8	+	?	+	-	+	-	Daniels *et al.* 2001
4D12	+	?	-	-	-	+	Van Beneden *et al.* 2001

dirigé contre le récepteur Ly49F. Ces chercheurs y sont arrivé en immunisant des souris BALB/c avec des cellules CHO (chinese hamster ovary cell) transfectées de façon stable avec l'allèle B6 du récepteur Ly49F. En utilisant cet anticorps, ils ont trouvé que ce récepteur était exprimé plus fréquemment que les autres récepteurs d'inhibition sur les lymphocytes T $CD8^+$ mémoires, et ce, malgré qu'il soit le membre de la famille Ly49 ayant la plus faible fréquence d'expression sur les cellules NK (comparé à Ly49A, C/I, I, G2 et D). Le récepteur Ly49F, selon cette étude, est exprimé sur environ 11% des cellules NK et sur environ 70% des cellules T $CD8^+$ $Ly49^+$ (Coles *et al.*, 2000). À l'exception de Ly49F, l'Ac HBF-719 ne réagit pas avec des cellules exprimant les récepteurs Ly49A à Ly49I, mais il n'a pas été testé sur des cellules transfectées avec Ly49J. Il est donc impossible de dire que cet Ac reconnaît uniquement le récepteur Ly49F.

L'immunisation de rats avec des cellules transfectées avec un ADNc chimère Ly49A/Ly49H codant pour la portion extracellulaire du récepteur Ly49H a permis de générer l'anticorps 3D10 (IgG1) qui réagit avec le récepteur Ly49H (Idris *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000). Grâce à ce réactif, la spécificité et le rôle de ce récepteur sur des cellules NK primaires ont pu être éclaircis (Smith *et al.*, 2000). Le pontage de cellules NK avec 3D10 a induit la cytotoxicité cellulaire et la production de cytokines. Grâce à cet anticorps, il a été possible de voir que le récepteur Ly49H est exprimé sur un sous-groupe de cellules NK et peut être coexprimé avec des récepteurs Ly49 d'inhibition. Les résultats de cette étude démontrent aussi que le récepteur Ly49H active des cellules NK primaires, et suggèrent que l'expression des récepteurs d'activation par les cellules NK pourrait être spécifiquement régulée sur un sous-groupe NK (Smith *et al.*, 2000). Il est à noter que lors de l'étude de spécificité, 3D10 a réagi faiblement avec les cellules transfectées exprimant fortement Ly49I. Ainsi, 3D10 ne semble donc pas réagir exclusivement avec le récepteur Ly49H. Cependant, on voit ici l'utilisation et toute l'importance d'avoir un AcMo pour la caractérisation d'un récepteur.

Il a été suggéré que les cellules NK contribuaient à la défense de l'hôte contre les infections, mais sans montrer que la résistance soit associée à un récepteur en particulier. Une nouvelle étude sur la susceptibilité de souches de souris à une infection au

cytomégalovirus (CMV) indique que le récepteur d'activation Ly49H est essentiel pour résister au virus (Casanova, Jouanguy et Abel, 2001). La première démonstration génétique que les cellules NK contribuent à l'immunité anti-virale montre que la délétion du gène *Ly49h* entraîne une susceptibilité à l'infection par le CMV murin (Lee *et al.*, 2001). Ce récepteur semble donc associé au gène $Cmv1^r$ et ce serait la présence de Ly49H qui pourrait avoir une action contre le virus. Ces études génétiques ont été coroborées par l'équipe de Yokoyama. Ces chercheurs ont notamment montré que les cellules NK de souris susceptibles à l'infection par le CMV murin ne réagissent pas avec l'anticorps 3D10 (Brown *et al.*, 2001). De plus, l'injection *in vivo*, à des souris résistantes, de l'Ac 3D10 a rendu ces souris sensibles à l'infection. Le récepteur d'activation Ly49H semble donc être spécifiquement impliqué dans la résistance à l'infection au CMV *in vivo* et semble être responsable du phénotype $Cmv1^r$.

Quant à l'anticorps 1F8, il a été produit en immunisant des rats Fisher avec un peptide synthétique codant pour le récepteur Ly49C couplé au KLH (Daniels *et al.*, 2001). Cet Ac a une triple réactivité puisqu'il reconnaît les récepteurs Ly49C, Ly49I et Ly49H. La déplétion *in vivo* des cellules $1F8^+$, par l'injection d'Ac chez la souris B6, a augmenté significativement le titre du virus CMV murin dans la rate et le foie alors que la déplétion avec l'Ac SW5E6 (Ly49C/I) n'a pas d'effet. Les auteurs concluent que la sous-population exprimant le récepteur Ly49H est probablement responsable de l'augmentation de la susceptibilité au CMV murin. Ces expériences constituent une des premières démonstrations qu'une sous-population de cellules NK pourrait contrôler une infection virale *in vivo*.

Le dernier anticorps (4D12) rapporté dans la figure 13 a été discuté précédemment. Rappelons brièvement que 4D12 reconnaît un épitope commun présent dans les récepteurs Ly49E et Ly49C et que grâce à cet Ac la protéine a été identifiée à la surface des cellules NK, LAK et des thymocytes fœtaux de souris de 17 jours de gestation. Le récepteur Ly49E aurait des propriétés d'inhibition (Van Beneden *et al.*, 2001).

Deux anticorps produits récemment (20D5 et 3S9) reconnaissent NKG2A, mais ils réagissent aussi avec les molécules NKG2C et NKG2E, ce qui limite leur utilisation (Vance, Jamieson et Raulet, 1999; Van Beneden *et al.*, 2001). Néanmoins, grâce à l'Ac 20D5, il a été possible d'établir que les molécules CD94/NKG2 sont les seuls récepteurs pour le Qa-1^b sur les cellules NK (Vance, Jamieson et Raulet, 1999). Il a également été possible d'établir à l'aide de l'AcMo 3S9 que la fréquence des cellules qui expriment les récepteurs CD94/NKG2 passe de 90% sur des cellules thymiques fœtales à 50% sur des cellules spléniques NK adultes. Enfin, durant la période de réalisation du projet, deux anticorps dirigés contre CD94 ont été produits (Vance, Jamieson et Raulet, 1999; Toyama-Sorimachi *et al.*, 2001). Contrairement aux anticorps anti-Ly49 ou anti-NKG2, ces anticorps n'ont pas de réactivité croisée avec un autre récepteur.

Donc, de tous les anticorps produits, qui ont fait l'objet de publications au cours du projet, la majorité reconnaît un motif commun à plus d'un récepteur.

CONCLUSION

L'objectif du projet était de produire des anticorps monoclonaux capables de reconnaître des séquences uniques aux récepteurs Ly49E, Ly49F, Ly49H et CD94/NKG2A. La grande homologie entre les récepteurs des familles Ly49 et CD94/NKG2 ainsi que la multispécificité des anticorps disponibles justifient notre approche qui était de rechercher des anticorps d'une spécificité pré-définie à l'aide de phages recombinants exprimant des séquences précises des récepteurs d'intérêt.

Plusieurs paramètres entrent en jeu dans la production d'anticorps monoclonaux, mais une chose est sûre, ce processus n'est pas simple et requiert un échantillonnage élevé. En effet, dans l'étude de Smith abordée précédemment, les chercheurs ont réussi à produire un AcMo dirigé contre le récepteur Ly49H. Environ 450 hybridomes ont été criblés avant de trouver la spécificité voulue (Smith *et al.*, 2000). Ce grand nombre d'hybridomes a été nécessaire dans un contexte dans lequel les animaux ont été immunisés avec des cellules n'exprimant qu'un seul récepteur Ly49. On peut facilement s'imaginer, que dans notre contexte, dans lesquels les animaux ont été immunisés avec des cellules exprimant plusieurs récepteurs et dans lequel le processus de criblage était très sélectif, le nombre de surnageants à cribler pour trouver l'Ac désiré aurait dû être largement supérieur, ce qui n'a pas été le cas. Pour les fusions effectuées en utilisant les cellules spléniques d'animaux immunisés avec des cellules LAK, seulement 133 surnageants ont été testés. Pour les fusions ayant fait appel à des animaux immunisés avec des cellules LAK et des phages recombinants, 340 puits ont été criblés tandis que dans le cas des fusions dans lesquelles des cellules fœtales ont servi d'immunogènes, 356 puits ont été testés. En regardant le faible nombre de puits testés pour chacune des stratégies, il n'est pas si surprenant qu'aucun AcMo n'ait pu être dépisté.

À l'exception des deux anticorps anti-CD94, tous les nouveaux anticorps produits durant la période de réalisation du projet reconnaissent plus d'un récepteur. Cet état de fait démontre bien que l'approche que nous avions choisie de rechercher plutôt des hybridomes produisant des anticorps d'une spécificité prédéterminée était judicieuse.

L'enjeu du projet était peut-être inaccessible vu les nombreuses contraintes, mais l'expérience valait d'être tentée. La production d'anticorps monoclonaux repose sur un certain nombre d'éléments difficilement contrôlables; la réussite d'un tel projet fait donc appel inévitablement à une question de chance. Notre laboratoire en avait eu beaucoup lors de la sélection de l'hybridome 4LO3311. À ce jour, cet anticorps est toujours le seul anticorps reconnaissant un seul membre du groupe apparenté au récepteur Ly49C. C'est également le seul anticorps qui reconnaît un épitope de la tige d'un récepteur Ly49.

D'autres alternatives concernant la stratégie d'immunisation auraient pu être explorées. L'utilisation de peptides synthétiques, par exemple, aurait pu être considérée, mais tout comme lors des immunisations avec les phages recombinants, l'immunogène n'aurait pas été présenté sous sa forme native. De plus, l'immunisation avec des cellules transfectées avec l'ADNc de chacun des récepteurs aurait pu être envisagée. Au moment du projet, nous n'avions malheureusement pas en main les ADNc des récepteurs d'intérêt et l'isolement de ces derniers aurait été trop long. L'utilisation de cellules transfectées par d'autres laboratoires, et tout récemment aussi par le nôtre, nous permet de croire que cette approche est plus efficace.

Malgré que nous n'ayons pas réussi à obtenir les anticorps de la spécificité désirée, les stratégies d'immunisations utilisées étaient pertinentes et le protocole de criblage employé demeure approprié et original pour détecter des anticorps d'une spécificité prédéterminée.

LISTE DES RÉFÉRENCES

ALDRICH, C, J., J. R. Rodgers et R. R. Rich. 1988. « Regulation of Qa-1 expression and determinant modification by an H-2D-linked gene, Qdm ». Immunogenetics, vol. 8, p. 334-44.

ALDRICH, C. J., A. DeCloux, A. S. Woods, R. J. Cotter, M. J. Soloski et J. Forman. 1994. « Identification of a Tap-dependent leader peptide recognized by alloreactive T cells specific for a class Ib antigen ». Cell, vol. 79, p. 649-58.

BAI, A., J. Broen et J. Forman. 1998. « The pathway for processing leader-derived peptides that regulate the maturation and expression of Qa-1b ». Immunity, vol. 9, p. 413-21.

BALLAS, Z. K., W. L. Rasmussen, C. A. Alber et M. Sandor. 1997. « Ontogeny of thymic NK1.1+ cells ». J Immunol, vol. 159, p. 1174-81.

BANCROFT, G. J. 1993. « The role of natural killer cells in innate resistance to infection». Curr Opin Immunol, vol. 5, p. 503-10.

BARTEN, R, et J. Trowsdale. 1999. « The human Ly-49L gene ». Immunogenetics, vol. 49, p. 731-4.

BASTIEN, N., M. Trudel et C. Simard. 1997. « Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus ». Virology, vol. 234, vol. 118-22.

BERG, S. F., E. Dissen, I. H. Westgaard et S. Fossum. 1998. « Two genes in the rat homologous to human NKG2 ». Eur J Immunol, vol. 28, p. 444-50.

BERKE, G. 1994. « The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects ». Annu Rev Immunol, vol. 12, p. 735-73.

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. 2287-2295.

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 interaction ». J Exp Med, vol. 183, p. 1553-1559.

BRENNAN, J., S. Lemieux, 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. 2085-2090.

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, W. M. Yokoyama. 2001. « Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection ». Science, vol. 292, p. 934-7.

CAMPBELL, K. S., et COLONNA, M (éd.). 2000. « Murine natural killer cell cloning from fetal thymic organ cultures ». Chap.5 In Natural killer cell protocol: cellular and molecular methods, p. 39-47. New Jersey: Humana Press.

CARLYLE, J. R, A. M. Michie, C. Furlonger, T. Nakano, M. J. Lenardo, C. J. Paige et J. C. Zuniga-Pflucker. 1997. «Identification of a novel developmental stage marking lineage commitment of progenitor thymocytes ». J Exp Med, vol. 186, p. 173-82.

CARLYLE, J. R., A. M. Michie, S. K. Cho et J. C. Zuniga-Pflucker. 1998. « Natural killer cell development and function precede alpha beta T cell differentiation in mouse fetal thymic ontogeny ». J Immunol , vol. 160, p. 744-53 .

CARLYLE, J. R., et J. C. Zuniga-Pflucker. 1998. « Lineage commitment and differentiation of T and natural killer lymphocytes in the fetal mouse ». Immunol Rev, vol. 165, p. 63-74.

CARLYLE, J. R., A. Martin, A. Mehra, L. Attisano, F. W. Tsui et J. C. Zuniga-Pflucker. 1999. « Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function ». J Immunol, vol. 162, p. 5917-23.

CARPEN, O., I. Virtanen, V. P. Lehto et E. Saksela. 1983. « Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells ». J Immunol, vol. 131, p. 2695-8.

CASANOVA, J. L., E. Jouanguy et L. Abel. 2001. « A virus finds its natural killer ». Nat Genet, vol. 28, p. 7-9.

CHALIFOUR, A., J, Roger, S, Lemieux et P. Duplay. 2001. Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with TCR-mediated activation. Manuscrit soumis.

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.

CHAN, P. Y., et F. Takei. 1989. « Molecular cloning and characterization of a novel murine T cell surface antigen, YE1/48 ». J Immunol, vol. 142, p. 1727-36.

CHINI, C. S., et P. J. Leibson. 2000. « Signal Transduction during natural killer cell activation ». Current Protocols in Immunology, 11.9B.1-11.9B.13.

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.

CONE, J. C., Y. Lu, J. M. Trevillyan, J. M. Bjorndahl et C. A. Phillips. 1993. « Association of the p56lck protein tyrosine kinase with the Fc gamma RIIIA/CD16 complex in human natural killer cells ». Eur J Immunol, vol. 23, p. 2488-97.

CORRAL, L., H. Takizawa, T. Hanke, A. M. Jamieson et D. H. Raulet. 1999. « A new monoclonal antibody reactive with several Ly49 NK cell receptor mediates redirected lysis of target cells ». Hybridoma, vol. 18, p. 359-366.

Current Protocol in Immunology. 1991. Production of monoclonal antibodies. Unit 2.5, supplement 13, p. 2.5.1-2.5.17. John Wiley and Sons, Inc. USA

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. 194, p. 29-44.

DAVIS, D. M., I. Chiu, M. Fassett, G. B. Cohen, O. Mandelboim et J. L. Strominger. 1999. « The human natural killer cell immune synapse ». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 96, p. 15062-7.

de la CRUZ, V. F., A. A. Lal, T. F. McCutchan. 1988. « Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage ». J Biol Chem, vol. 263, p. 4318-22.

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.

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

DISSEN, E., S. F. Berg, I. H. Westgaard et S. Fossum. 1997. « Molecular characterization of a gene in the rat homologous to human CD94 ». Eur J Immunol, vol. 27, p. 2080-2086.

DISSEN, B. S. F., I. H. Westgaard et S. Fossum. 1998. « Two genes in the rat homologous to human NKG2 ». Eur J Immunol, vol. 28, p.444-450.

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

ERIKSSON, M., J. C. Ryan, M. C. Nakamura et C. L. Sentman. 1999b. « Ly49A inhibitory receptors redistribute on natural killer cells during target cell interaction ». Immunology, vol. 97, p. 341-7.

GALFRE, G., P. Monaci, A. Nicosia, A. Luzzago, F. Felici et R. Cortese. 1996. «Immunization with phage-displayed mimotopes ». Methods Enzymol, vol. 267, p. 109-15.

GEORGE, T. C., L. H. Mason, J. R. Ortaldo, V. Kumar et M. Bennett. 1999. « Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells ». J Immunol, vol. 162, p. 2035-43.

GIORDA, R., W. A. Rudert, C. Vavassori, W. H. Chambers, J. C. Hiserodt et M. Trucco. 1990. NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. Science, vol. 249, p. 1298-300.

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 mobolization, and cytokine sécrétion by Ly49H ». J Leukoc Biol, vol. 66, p. 165-171.

GRABOWSKA, A. M., R. Jennings, P. Laing, M. Darsley, C. L. Jameson, L. Swift et W. L. Irving. 2000. « Immunisation with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2 ». Virology, vol. 269, p. 47-53.

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., J. Roland et D. H. Raulet. 1995. « Allelic exclusion of Ly49-family genes encoding class I MHC-specific receptors on NK cells ». Nature , vol. 376. p. 355-8.

HELD, W., J. R. Dorfman, M. F. Wu et D. H. Raulet . 1996. « Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire ». Eur J Immunol, vol. 26, p. 2286-92.

HELD, W., et B. Kunz. 1998. « An allele-specific, stochastic gene expression process controls the expression of multiple Ly49 family genes and generates a diverse, MHC-specific NK cell receptor repertoire ». Eur J Immunol, vol. 28, p. 2407-16.

HELD, W., B. Kunz, V. Ioannidis et B. Lowin-Kropf. 1999. « Mono-allelic Ly49 NK cell receptor expression ». Semin Immunol, vol. 11, p. 329-355.

HERBERMAN, R. B. 1982. « NK cell and other natural effector cells ». New York, Academic.

HO, E. L., J. W. Heusel, M. G. Brown, K. Matsumoto, A. A. Scalzo et W. M. Yokoyama. 1998. « Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells ». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, p. 6320-5.

HÖGLUND, P., J. Sundbäck, M. Y. Olsson-Alheim, M. Johansson, M. Salcedo, C. Öhlen, H. G. Ljunggren et K. Kärre. 1997. « Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse ». Immunol Rev, vol. 155, p. 11-28.

HOUCHINS, J. P., T. Yabe, C. McSherry et F. H. Bach. 1991. «DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells ». J Exp Med, vol. 173, p. 1017-20.

IDRIS, A. H., K. Iizuka, H. R. C. Smith, A. A. Scalzo et W. M. Yokoyama. 1998. « Genetic control of natural killing and in vivo tumor elimination by the *chock* locus ». J Exp Med, vol. 188, p. 2243-2256.

JIN, L., B. M. Fendly et J. A. Wells. 1992. « High resolution functional analysis of antibody-antigen interactions ». J Mol Biol, vol. 226, p. 851-65.

KARRE, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek et R. Kiessling. 1986. « Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy ». Nature, vol. 319, p. 675-8.

KARLHOFER, F. M., et W. M. Yokoyama 1991. « Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways ». J Immunol, vol. 146, p. 3662-73.

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

KARLHOFER, F. M., R. Hunziker, A. Reichlin, D. H. Margulies, 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.

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.

KRAFT, J. R., R. E. Vance, J. Pohl, A. M. Martin, D. H. Raulet et P. E. Jensen. 2000. « Analysis of Qa-1^b peptide binding specificity and the capacity of CD94/NKG2A to discriminate between Qa-1-peptide complexes ». J Exp Med, vol. 192, p. 613-623.

KUBO, S., Y. Itoh, N. Ishikawa, R. Nagasawa, T. Mitarai, N. Maruyama. 1993. « The gene encoding mouse lymphocyte antigen Ly-49: structural analysis and the 5'-flanking sequence ». Gene, vol. 136, p. 329-31.

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

KUPFER, A., et S. J. Singer. 1989. « Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples ». Annu Rev Immunol, vol. 7, p. 309-37.

LANIER, L. L., C. Chang et J. H. Phillips. 1994. « Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes ». J Immunol, vol. 153, p. 2417-28.

LANIER, L. L. 1998. « NK cell receptors ». Ann Rev Immunol, vol. 16, p. 359-93.

LANIER, L. L., B. C. Corliss, J. Wu, C. Leong et J. H. Phillips. 1998. « Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells ». Nature, vol. 391, p. 703-7.

LANIER, L. L. 2000. « Turning on natural killer cells ». J Exp Med, vol. 191, p. 1259-1262.

LEE, N., D. R. Goodlett, A. Ishitani, H. Marquardt et D. E. Geraghty. 1998. « HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependant peptides derived from certain HLA class I signal sequences ». J Immunol, vol. 160, p. 4951-4960.

LEE, S. H., S. Girard, D. Macina, M. Busa, A. Zafer, A. Belouchi, P. Gros, S. M. Vidal. 2001. « 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.

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. 2002. « Stratégie de production d'anticorps monoclonaux spécifiques de Ly49B, un récepteur particulier des cellules NK murines ». Mémoire de MSc, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval.

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.

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

LOPEZ-CABRERA, M., A. G. Santis, E. Fernandez-Ruiz, R. Blacher, F. Esch, P. Sanchez-Mateos, F. Sanchez-Madrid. 1993. « Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors ». J Exp Med, vol. 178, p.537-47.

LJUNGGREN, H. G., et K. Karre. 1985. « Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism ». J Exp Med, vol. 162, p. 1745-59.

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

LUSSIER, I. 1997. Production d'antisérums spécifiques à la P-glycoprotéine à l'aide de phages recombinants. Mémoire de MSc, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, Laval.

MANOUSSAKA, M. S., R. J. Smith, V. Conlin, J. A. Toomey et C. G. Brooks. 1998. « Fetal mouse NK cell clones are deficient in Ly49 expression, share a common broad lytic specificity, and undergo continuous and extensive diversification in vitro ». J Immunol, vol. 160, p. 2197-206.

MAKRIGIANNIS, A. P., P. Gosselin, L. H. Mason, L. S. Taylor, D. W. McVicar, J. R. Ortaldo et S. K. Anderson. 1999. « Cloning and characterization of a novel activating Ly49 closely related to Ly49A ». J Immunol, vol. 163, p. 4931-8.

MAKRIGIANNIS, A., et S. K. Anderson. 2000. « Ly49 gene expression in different inbred mouse strains ». Immunol Research, vol. 21, p. 39-47.

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

MAKRIGIANNIS, A. P., J. Etzler, R. Winkler-Pickett, A. Mason, J. R. Ortaldo et S. K. Anderson. 2000. « Identification of the Ly49L protein: evidence for activating counterparts to inhibitory Ly49 proteins ». J Leukoc Biol, vol. 68, p. 765-71.

MAKRIGIANNIS, A. P., A. T. Pau, A. Saleh, R. Winkler-Pickett, J. R. Ortaldo et S. K. Anderson. 2001. « Class I MHC-binding characteristics of the 129/j Ly49 repertoire ». J Immunol, vol. 166, p. 5034-43.

MANILAY, J. O., G. L. Waneck, et M. Sykes. 1999. « Levels of Ly-49 receptor expression are determined by the frequency of interactions with MHC ligands: evidence against receptor calibration to a "useful" level ». J Immunol, vol. 163, p. 2628-33.

MASON, L., S. L. Giardina, T. Hecht, J. Ortaldo et B. J. Mathieson. 1988. « LGL-1: a non-polymorphic antigen expressed on a major population of mouse natural killer cells ». J Immunol. Vol. 140, p. 4403-12.

MASON, L. H., S. K. Anderson, W. M. Yokoyama, H. R. Smith, R. Winkler-Pickett et J. R. Ortaldo. 1996. « The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells ». J Exp Med, vol. 184, p. 2119-28.

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.

McQUEEN, K., J. D. Freeman, F. Takei et D. L. Mager. 1998. « Localization of five new *Ly49* genes, including three closely related to *Ly49c* ». Immunogenetics, vol. 48, p. 174-183.

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.

MEOLA, A., P. Delmastro, P. Monaci, A. Luzzago, A. Nicosia, F. Felici, R. Cortese et G. Galfre. 1995. « Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage ». J Immunol, vol. 154, p. 3162-72.

MORELLI, L. et S. Lemieux. 1993. «Triggering of the cytotoxic activity of murine natural killer and lymphokine-activated killer cells through the NK2.1 antigen ». J Immunol, vol. 151, p. 6783-93.

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.

NAKAMURA, M. C., S. Hayashi, E. C. Niemi, J.C. Ryan et W. E. Seaman. 2000. « Activating Ly-49D and inhibitory Ly-49A natural killer cell receptors demonstrate distinct requirements for interaction with H2-D(d) ». J Exp Med, vol. 192, p. 447-54.

O'CALLAGHAN, C. A. 2000. « Natural killer cell surveillance of intracellular antigen processing pathways mediated by recognition of HLA-E and Qa-1b by CD94/NKG2 receptors ». Microbes and infection, vol. 2, p. 371-380.

OLCESE, L., P. Lang, F. Vely, A. Cambiaggi, D. Marguet, M. Blery, K. L. Hippen, R. Biassoni, A. Moretta, L. Moretta, J. C. Cambier et E. Vivier. 1996. « Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases ». J Immunol, vol. 156, p. 4531-4.

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

OLSSON, M. Y., K. Karre 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 high and Ly49A low NK cells ». J Immunol, vol. 159, p. 3189-94.

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

PARMLEY, S. F., et G. P. Smith. 1988. « Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes ». Gene, vol. 73, p. 305-18.

PETERS, J. H., R. K. H. Gieseler. 1992. In J. H. Peters et H. Baumgarten, (éd). Monoclonal Antibodies. Springer Laboratory, Now York, p. 139-144.

PLOUGASTEL, B., et J. Trowsdale. 1997. « Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes ». Eur J Immunol, vol. 27, p. 2835-9.

POPKOV, M, S. Sidrac-Ghali, V. Alakhov et R. Mandeville. 2000. "Epitope-specific antibody response to HT-1080 fibrosarcoma cells by imotope immunization". Clin Cancer Res, vol. 6, p. 3629-35.

RAULET, D. H., et W. Held. 1995. « Natural killer cell receptors : the offs and ons of NK cell recognition ». Cell, vol. 82, p. 697-700.

ROLSTAD, B., R. B. Herberman et C. W. Reynolds. 1986. « Natural killer cell activity in the rat. V. The circulation patterns and tissue localization of peripheral blood large granular lymphocytes (LGL) ». J Immunol, vol. 136, p. 2800-8.

ROLSTAD, B., et W. E Saeman. 1998. « Natural killer cells and recognition of MHC class I molecules : new perspectives and challenges in immunology ». Scand J Immunol, vol. 47, p. 412-425.

RYAN, J. C., E. C. Niemi, R. D. Goldfien, J. C. Hiserodt et W. E. Seaman. 1991. « NKR-P1, an activating molecule on rat natural killer cells, stimulates phosphoinositide turnover and a rise in intracellular calcium ». J Immunol, vol. 147, p. 3244-50.

RYAN, J. C., E. C. Niemi, M. C. Nakamura et W. E. Seaman. 1995. « NKR-P1A is a target-specific receptor that activates natural killer cell cytotoxicity ». J Exp Med, vol. 181, p. 1911-5.

RYAN, J. C., et W. E. Seaman. 1997. « Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells ». Immunol Rev, vol. 155, p. 79-89.

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.

SALCEDO, M., P. Bousso, H. G. Ljunggren, P. Kourilsky et J. P. Abastado. 1998. « The Qa-1b molecule binds to a large subpopulation of murine NK cells ». Eur J Immunol, vol. 28, p. 4356-61.

SALCEDO, M., F. Colucci, P. J. Dyson, L. A. Coterill, F. A. Lemonnier, P. Kourilsky, J. P. Di Santo, H. G. Ljunggren et J. P. Abastado. 2000. « Role of Qa-1^b-bonding receptors in the specificity of developing NK cells ». Eur J Immunol, vol. 30, p. 1094-1101.

SCOTT, J. K., et G. P. Smith. 1990. « Searching for peptide ligands with an epitope library ». Science, vol. 249, p. 386-90.

SENTMAN, C. L., J. Jr. Hackett, V. Kumar et M. Bennett. 1989. « Identification of a subset of murine natural killer cells that mediates rejection of Hh-1d but not Hh-1b bone marrow grafts ». J Exp Med, vol. 170, p. 191-202.

SENTMAN, C. L., M. Y. Olsson et K. Karre. 1995. « Missing self recognition by natural killer cells in MHC class I transgenic mice. A 'receptor calibration' model for how effector cells adapt to self ». Semin Immunol, vol, 2, p. 109-19.

SHARP, P. M., E. Cowe, D. G. Higgins, C. D. Shields, K. H. Wolfe et F. Wright. 1988. « Codon usage patterns in Escherichia coli, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Drosophila melanogaster and Homo sapiens; a review of the considerable within-species diversity ». Nucleic Acids Res., vol. 16, p. 8207-8211.

SHULTZ, L. D., P. A. Schweitzer, T. V. Rajan, T. Yi, J. N. Ihle, R. J. Matthews, M. L. Thomas et D. R. Beier. 1993. « Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene ». Cell, vol. 73, p. 1445-54.

SILVER, E., J. F. Elliott et K. P. Kane. 1996. « Alternatively spliced Ly-49D and H transcripts are found in IL-2-activated NK cells ». Immunogenetics, vol. 44, p. 478-482.

SILVER, E. T., J. C. T. Lau et K. P. Kane. 1999. « Molecular cloning of mouse NKG2A and C ». Immunogenetics, vol. 49, p. 727-730.

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. E. 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. 2333-2341.

SIVAKUMAR, P. V., A. Gunturi, M. Salcedo, J. D. Schatzle, W. C. Lai, Z. Kurepa, L. Pitcher, M. S. Seaman, F. A. Lemonnier, M. Bennett, J. Forman et V. Kumar. 1999. « Cutting edge : expression of functionnal CD94/NKG2A inhibitory receptors on fetal NK1.1^{+}Ly49^{-} cells : a possible mechanism of tolerance during NK cell development ». J Immunol, vol. 162, p. 6976-6980.

SMITH, H. R. C., F. M. Karlhofer et W. M. Yokoyama. 1994. « Ly-49 multigene family expressed by IL-2 activated NK cells ». J Immunol, vol. 153, p. 1068-1079.
SMITH, K. M., J. Wu, A. B. H. Bakker, J. H. Phillips et L. L. Lanier. 1998. « Cutting edge : Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors ». J Immunol, vol. 161, p. 7-10.

SMITH, H. R. C., 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. 1241-1354.

SOLANA, R., et E. Mariani. 2000. « NK and NK/T cells in human senescence ». Vaccine, vol. 18, p. 613-20.

TAKEI, F. 1983. « Two surface antigens expressed on proliferating mouse T lymphocytes defined by rat monoclonal antibodies ». J Immunol, vol. 130, p. 2794-7.

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

TOOMEY, J. A., S. Shrestha, S. A. de la Rue, F. Gays, J. H. Robinson, Z. M. Chrzanowska-Lightowlers et C. 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.

TOOMEY, J. A., M. Salcedo, L. A. Cotterill, M. M. Millrain, Z. Chrzanowska-Lightowlers, J. Lawry, K. Fraser, F. Gays, J. H. Robinson, S. Shrestha, P. J. Dyson et C. G. Brooks. 1999. « Stochastic acquisition of Qa1 receptors during the development of fetal NK cells in vitro accounts in part but not in whole for the ability of these cells to distinguish between class I-sufficient and class I-deficient targets ». J Immunol, vol. 5, p. 3176-84.

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.

TOYAMA-SORIMACHI, N,, Y. Taguchi, H. Yagita, F. Kitamura, A. Kawasaki, S. Koyasu et H. Karasuyama. 2001. « Mouse CD94 participates in Qa-1-mediated self recognition by NK cells and delivers inhibitory signals independent of Ly-49 ». J Immunol, vol. 166, p. 3771-9.

TSUI, H. W., K. A. Siminovitch, L. de Souza et F. W. Tsui. 1993. « Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene ». Nat Genet, vol. 4, p. 124-9.

VAN BENEDEN, K., A. De Creus, V. Debacker, J. De Boever, J. Plum. et G. Leclercq. 1999. « Murine fetal natural killer cells are functionally and structurally distinct from adult natural killer cells ». J Leukoc Biol, vol. 66, p. 625-33.

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.

VANCE, R. E., D. M. Tanamachi, T. Hanke et D. H. Raulet. 1997. « Cloning of a mouse homolog of CD94 extends the family of C-type lectins on murine natural killer cells ». Eur J Immunol, vol. 27, p. 3236-3241.

VANCE, R. E., et D. H. Raulet. 1998. « Toward a quantitative analysis of the repertoire of class I MHC-specific inhibitory receptors on natural killer cells ». Curr Top Microbiol Immunol, vol. 230, p. 135-60.

VANCE, R. E., J. R. Kraft, J. D. Altman, P. E. Jensen et D. H. Raulet. 1998. « Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1^b ». J Exp Med, vol. 188, p. 1841-1848.

VANCE, R. E., A. M. Jamieson et D. H. Raulet. 1999. « Recognition of the class Ib molecule Qa-1^b by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKD2E on mouse natural killer cells ». J Exp Med, vol. 190, p. 1801-1812.

VÉLY, F., et E. Vivier. 1996. « Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK ». Médecine/Sciences, vol. 12, p. 458-64.

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.

WELSH, R. M. 1978. « Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction ». J Exp Med, vol. 148, p. 163-81.

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. 28, p. 1839-46.

WHITELAW, P. F., et B. A. Croy. 1996. « Granulated lymphocytes of pregnancy ». Placenta, vol. 17, p. 533-43.

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.

WINDEBANK, K. P., R. T. Abraham, G. Powis, R. A. Olsen, T. J. Barna et P. J. Leibson. 1988. « Signal transduction during human natural killer cell activation: inositol phosphate generation and regulation by cyclic AMP ». J Immunol, vol. 141, p. 3951-7.

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. 147, p. 1417-23.

YOKOYAMA, W. M., P. J. Kehn, D. I. Cohen et E. M. Shevach. 1990. « Chromosomal location of the Ly-49 (A1, YE1/48) multigene family. Genetic association with the NK 1.1 antigen ». J Immunol, vol. 145, p. 2353-8.

YOKOYAMA, W. M., J. C. Ryan, J.J. Hunter, H. R. Smith, M. Stark et W. E. Seaman. 1991. « cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with LY-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6 ». J Immunol, vol. 147, p. 3229-36.

YOKOYAMA, W. M., et W. E. Seaman. 1993. « The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex ». Annu Rev Immunol, vol. 1, p. 613-35.

YOKOYAMA, W. M. 1995. « Natural killer cell receptors specific for major histocompatibility complex class I molecules ». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 92, p. 3081-5.

YOKOYAMA, W. M. 1997. « What goes up must come down : the emerging spectrum of inhibitory receptors ». J Exp Med, vol. 186, p. 1803-1808.

YOKOYAMA, W. M. 1998. « Natural killer cell receptors ». Curr Opin Immunol, vol. 10, p. 298-305.

ZIEGLER, S. F., S. D. Levin, L. Johnson, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, E. Baker, G. R. Sutherland, A. L. Feldhaus et F. Ramsdell. 1994. « The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex ». J Immunol, vol. 152, p.1228-36.

ANNEXE I

Tableau I. Tableau récapitulatif de la purification et la concentration des oligonucléotides ET1, ET2, EC1, EC2, EC3, FT, FC, HT, HC, 2AT, CD94 et V.

Molécules	**Brin**	**Concentration initiale** (pmole/ml)	**% purification**	**Concentration finale** (mg/ml)
Ly49E Tige 1	A	66	82.4	1.46
	B	85	83.2	2.10
Ly49E Tige 2	A	100	90	2.718
	B	64	85	2.380
Ly49E CRD 1	A	117	87.9	3.06
	B	76	91.2	2.32
Ly49E CRD 2	A	99	90	2.314
	B	107	92.2	1.724
Ly49E CRD 3	A	68	81.4	1.727
	B	78	80.0	2.138
Ly49F Tige	A	102	83.5	1.38
	B	58	94.2	2.94
Ly49F CRD	A	103	83.7	1.74
	B	29	91.3	0.80
Ly49H Tige	A	60	81.1	0.40
	B	97	87.9	1.19
Ly49H CRD	A	157	90.0	4.24
	B	127	87.7	4.07
NKG2A Tige	A	100	85.2	1.855
	B	95	83.5	2.382
CD94 Tige	A	175	83.4	3.46
	B	104	91.0	2.69
PolyV	A	71	94.2	1.658
	B	109	83.8	2.120

La lettre A indique le brin matrice tandis que la lettre B indique le brin complémentaire.

Tableau II. Concentration des phages contenant divers inserts suite à l'amplification.

Phage	Concentration (phages/ml)	Volume (ml)
ET1	5×10^{12}	6.78
ET2	5×10^{12}	15.5
EC1	5×10^{12}	13.0
EC2	5×10^{12}	10.2
EC3	5×10^{12}	9
FT	5×10^{12}	12.0
FC	5×10^{12}	7.34
HT	5×10^{12}	13.4
HC	5×10^{12}	25.2
2AT	5×10^{12}	65
CD94	5×10^{12}	18.7
V	5×10^{12}	63

ANNEXE II

LB ("luria broth")

1% de bacto-tryptone
0,5% d'extrait de levure
1% de NaCl

(Difco laboratories)

SOC

20% bacto-tryptone
5% d'extrait de levure
100mM NaCl
250mM KCl
1% de glucose 2M

(Difco laboratories)

NaP pH7,0

NaCl 80 mM
NH_4HPO_4 50 mM

TE pH8,0

Tris-HCl 10 mM
EDTA 1 mM

PEG/NaCl

16,7% PEG 8000
3,3 M NaCl

DMEMc (utilisé lors des fusions)

2 mM de L-glutamine
50 µM de β-2-mercaptoéthanol (Fisher)
100 U/ml de pénicilline
100 µg/ml de streptomycine
1% d'acides aminés essentiels
2,5 µg/ml de fongizone

(Gibco BRL)

DMEMc/H/P/20%SVF

10 mM d'acide N'-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique (HEPES)
1 mM sodium pyruvate
20% de SVF

(Gibco BRL)