

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE
DE RÉCEPTEURS D'INHIBITION
APPARTENANT À LA FAMILLE Ly49**

Par
Anick Chalifour

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiæ doctor (Ph.D.)
en Virologie et Immunologie

Membres du jury d'évaluation

Dr. Claude Daniel	Président de jury
Dr. Suzanne Lemieux	Directrice de recherche
Dr. Pascale Duplay	Co-directrice de recherche
Dr. Sylvie Fournier	Examineur externe
Dr. Ali Ahmad	Examineur externe

Décembre 2002

*«Quand on a éliminé tout ce qui est impossible, ce qui reste,
aussi improbable soit-il, ne peut être que la vérité.»*

Sherlock Holmes

SOMMAIRE

Les cellules cytotoxiques naturelles (NK) expriment plusieurs récepteurs d'inhibition et d'activation, dont certains possèdent comme ligands les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Chez la souris, plusieurs membres de la famille Ly49 reconnaissent ces molécules. Les récepteurs Ly49 inhibiteurs possèdent dans leur queue cytoplasmique un ITIM ("Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif"), qui une fois phosphorylé, initie un signal d'inhibition. La cascade de signaux d'activation est donc interrompue et par conséquent, la cellule NK est inapte à attaquer la cellule cible reconnue. La liaison de ligands aux récepteurs d'inhibition préviendrait l'enclenchement du mécanisme de lyse des cellules NK envers les cellules autologues saines de l'hôte et préviendrait ainsi l'auto-immunité. Les récepteurs Ly49 activateurs possèdent quant à eux, un acide aminé chargé dans leur portion transmembranaire qui leur permet de s'associer à DAP12, une protéine adaptatrice contenant un ITAM ("Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif"). Suite à l'engagement du récepteur, ce motif est phosphorylé ce qui enclenche alors une cascade de signaux qui se solde par l'activation de la cellule NK. La résultante de la somme des signaux activateurs et inhibiteurs déterminerait l'état fonctionnel de la cellule NK et par conséquent, le sort de la cellule reconnue. Le polymorphisme des récepteurs Ly49, la co-expression de plusieurs récepteurs sur une même cellule ainsi que leur spécificité de liaison pour des haplotypes particuliers des molécules du CMH-I, ne seraient que quelques-uns des éléments pouvant contribuer à la constitution du répertoire des cellules NK.

Le premier volet de ce projet de recherche avait pour but de déterminer l'implication de récepteurs Ly49 dans la résistance à l'infection par le cytomégalovirus murin (MCMV). Il avait été établi que les cellules NK sont responsables de cette résistance et que le gène *Cmv1*, qui la contrôle, est codé dans la même région chromosomique que les membres de la famille Ly49. Cela soulevait la possibilité d'une identité entre *Cmv1* et un des gènes *Ly49*. Les stratégies employées pour vérifier cette hypothèse furent donc premièrement de tenter de réduire le nombre de candidats potentiels en limitant l'étendue de la région du

Cmv1 et deuxièmement, de tenter d'abolir le phénotype de résistance des souris en éliminant différentes sous-populations de cellules NK à l'aide d'injections d'anticorps anti-Ly49. Selon nos observations, aucune des populations NK ciblées exprimant Ly49A, Ly49C, Ly49I et/ou Ly49G2 ne semble jouer de rôle majeur dans la résistance contre le MCMV. Par ailleurs, le suivi de la variation du niveau d'expression des récepteurs Ly49 et de la taille relative des populations de cellules NK les exprimant, nous indique que ces deux paramètres subissent des changements significatifs au cours de l'infection. Ces résultats suggèrent que des sous-populations de cellules NK pourraient contribuer différemment au phénotype de résistance.

L'identification de récepteurs NK (NKR) inhibiteurs à la surface de certaines sous-populations de lymphocytes T a élargi le rôle de ces récepteurs, qui était initialement limité à contrôler l'activité des cellules NK, à d'autres populations cellulaires. Plusieurs travaux démontrent que certaines fonctions des cellules T sont affectées par la présence de NKR lorsqu'ils interagissent avec leurs ligands. La fonction de ces récepteurs pourrait donc être beaucoup plus importante que ce que l'on avait initialement anticipé.

Le deuxième volet consistait à déterminer comment l'avidité des récepteurs Ly49 pourrait moduler leur capacité à inhiber un signal initié via le TCR. Les récepteurs Ly49 étant exprimés sur des sous-populations chevauchantes de lymphocytes T et possédant différents ligands communs, il était important de développer un système nous permettant de mesurer sélectivement la conséquence fonctionnelle de l'engagement d'un récepteur Ly49 donné, avec son ou ses ligands. Pour ce faire, nous avons généré des clones de cellules T exprimant différents niveaux des récepteurs Ly49A ou Ly49C. Les résultats démontrent qu'à la fois le niveau d'expression d'un récepteur Ly49 inhibiteur et son affinité pour son ligand, influencent la puissance avec laquelle il interfère avec l'activation des lymphocytes T.

Le troisième volet de cette thèse portait sur l'étude de la capacité de récepteurs Ly49 d'inhiber l'apoptose des lymphocytes T induite suite à la stimulation via leur complexe

TCR/CD3 (“Activation-Induced Cell Death” ou AICD). Suite à une stimulation antigénique, la majorité des cellules T activées sont éliminées par apoptose, ce qui met fin à la réponse immune en limitant leur expansion clonale et par le fait même, assure l’homéostasie du système immunitaire. La faible proportion de lymphocytes T activés qui échappent à l’AICD, constitue le pool de cellules T mémoires. Or, les récepteurs Ly49 sont exprimés à la surface de cellules T mémoires et les souris exprimant à la surface de leurs cellules T un récepteur Ly49 inhibiteur comme transgène, montrent une accumulation de cellules T Ly49⁺ mémoires. Ceci suggère donc que les récepteurs Ly49 puissent jouer un rôle dans la survie des cellules mémoires en inhibant l’AICD. Les résultats que nous avons obtenus démontrent qu’effectivement, l’engagement de Ly49A par son ligand H-2D^d, interfère avec l’AICD des cellules T activées via leur TCR.

Dans l’ensemble, les travaux présentés dans cette thèse soulignent l’importance des récepteurs Ly49 inhibiteurs dans la régulation de différentes fonctions des cellules immunes qui les expriment.



Anick Chalifour



Dr Suzanne Lemieux

Directrice de recherche

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Table des Matières	vi
Liste des abréviations	viii
Liste des figures de la revue bibliographique	ix
Liste des annexes	x
<i>Introduction</i>	1
<i>Avant-propos</i>	5
<i>Chapitre 1 : Revue Bibliographique</i>	8
Les cellules NK	9
Découverte	9
Propriétés	9
Modes de reconnaissance	10
Rôles biologiques des cellules NK	13
Les récepteurs des cellules NK	15
Cascades de signaux intracellulaires	22
Les récepteurs de la famille Ly49	26
Développement du répertoire de récepteurs Ly49 des cellules NK	27
Ligands	33
Rôles des récepteurs Ly49 exprimés à la surface des cellules NK	38
Les cellules NK et la résistance antivirale	40
CMV	40
Stratégies d'échappement du CMV au système immunitaire	41
MCMV	44
Les sous-populations de lymphocytes T exprimant des récepteurs NK	46
Les cellules NKT restreintes par CD1d	47
Les lymphocytes T CD8 ⁺ exprimant des récepteurs Ly49	52
Rôles des récepteurs Ly49 exprimés à la surface des cellules T	53
<i>Chapitre 2 : Article I : Assessment of Cmv1 candidates by genetic mapping and in vivo antibody depletion of NK cell subsets</i>	56
Mise en contexte de l'Article I	57
Article I	60
<i>Chapitre 3 : Article II : Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with TCR-mediated activation</i>	73
Mise en contexte de l'Article II	74
Article II	77

Chapitre 4 : Article III : Ly49A inhibits TCR/CD3-induced apoptosis and IL-2 secretion	113
Mise en contexte de l'Article III	114
Article III	117
Chapitre 5 : Discussion générale	123
Partie I	
Évaluation de candidats potentiels pour le gène de résistance <i>Cmv1</i>	125
Cartographie génétique	125
Expression des molécules Ly49 au cours de l'infection	129
Déplétion in vivo de sous-populations de cellules NK	133
Conclusion et Perspectives de la partie I	137
Partie II	
Étude de l'impact de l'avidité des récepteurs Ly49 sur leur capacité de signalisation	140
Niveau d'expression des récepteurs Ly49	140
Affinité des récepteurs Ly49 pour leur(s) ligand(s)	143
Identification de ligand(s) fonctionnel(s)	144
Conclusion et perspectives de la partie II	146
Partie III	
Étude de la capacité de récepteurs Ly49 d'interférer avec certains mécanismes permettant la survie des lymphocytes T activés	148
L'engagement du récepteur Ly49A inhibe l'AICD de cellules T activées	148
Caractérisation des mécanismes pouvant être impliqués dans la régulation de l'AICD par le récepteur Ly49A	149
Conclusion et perspectives de la partie III	151
Conclusion Générale	153
Remerciements	156
Références	158
Annexe A	202
Annexe B	204
Annexe C	207
Annexe D	209
Annexe E	211
Annexe F	213

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcMo	Anticorps Monoclonal(aux)
α GalCer	Alpha-galactosylcéramide
AICD	Activation-Induced Cell Death
β_2 m	β_2 -microglobuline
B6	C57BL/6
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMH-I	CMH de classe I
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
FasL	Fas Ligand
IFN	Interféron
IL	Interleukine
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
KIR	Killer Inhibitory Receptor
KLRG1	Killer cell Lectin-Like receptor G1
LIR	Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor
MCMV	Murine CMV
NK	Natural Killer
NKC	NK gene Complex
NKR	NK Receptor
NKT	Lymphocyte T exprimant un récepteur NK et restreint par CD1
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
PTP	Protéine Tyrosine Phosphatase
SEE	Staphylococcal Enterotoxin E
SH2	Src Homology 2 domain
SHP	SH2-containing Phosphatase

LISTE DES FIGURES DE LA REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

- Figure 1. *Carte génétique du chromosome 6 murin dans la région du NKC.*
- Figure 2. *Représentation schématique des récepteurs de la famille Ly49.*
- Figure 3. *Cascades de signaux intracellulaires initiés via les récepteurs des cellules NK.*
- Figure 4. *Modèle de la "calibration" des récepteurs Ly49.*

LISTE DES ANNEXES

- Annexe A. *Tableau 1 : Spécificités des récepteurs Ly49 le plus souvent mentionnés dans le texte pour les haplotypes H-2^d et H-2^b.*
- Annexe B. *Tableau 2 : Spécificités des récepteurs Ly49A et Ly49C pour les haplotypes H-2^d et H-2^b.*
- Annexe C. *Figure 6 : Comparative analysis of the level of expression of Ly49A and Ly49C receptors on Jurkat cell transfectants with those found on normal NK/NK1.1⁺ T cells.*
- Annexe D. *Figure 5 : Corrélation entre l'efficacité de déplétion des cellules NK1.1⁺ et la susceptibilité au MCMV de souris C57BL/6.*
- Annexe E. *Publications*
- Annexe F. *Communications*

Introduction

L'étude des récepteurs des cellules cytotoxiques naturelles (NK) est un domaine de recherche en pleine effervescence. En effet, ces récepteurs sont exprimés à la surface de plusieurs types cellulaires, reconnaissent divers types de ligands, appartiennent à des familles distinctes comptant des membres ayant des fonctions opposées (récepteurs activateurs et inhibiteurs) et certains possèdent des homologues chez plusieurs espèces, dont l'humain et les rongeurs. L'ensemble des analyses fonctionnelles effectuées jusqu'à maintenant, indique clairement l'importance que peuvent avoir ces récepteurs dans la régulation de l'état d'activation d'une cellule.

Les cellules NK constituent une population effectrice importante du système immunitaire. Ces leucocytes sont impliqués notamment dans la surveillance contre les tumeurs et les maladies infectieuses, de même que dans le rejet de greffes de moelle osseuse de nature allogénique. Les cellules NK participent également à la régulation de l'hématopoïèse. L'activité biologique de ces cellules s'effectue par le biais de la synthèse de cytokines et de l'activité cytotoxique. Un contact étroit entre la cellule NK et la cellule cible est requis pour initier ces activités. Il a récemment été établi que certains des récepteurs NK (NKR), dont notamment les récepteurs Ly49 murins, se lient à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Cependant, alors que les lymphocytes T cytotoxiques sont activés par la reconnaissance du non-soi, l'activité cytotoxique des cellules NK est au contraire tenue en échec par la reconnaissance des antigènes du soi. La réduction de l'expression des antigènes du CMH-I, leur modification ou leur élimination, par exemple lors d'une infection virale ou d'une transformation maligne, feraient obstacle à l'interaction des récepteurs Ly49 inhibiteurs avec leurs ligands et rendraient les cellules affectées sensibles à l'activité NK.

Cependant, pour bon nombre de ces récepteurs, aucune propriété fonctionnelle n'a été démontrée, faute de réactifs appropriés pour les étudier. De plus, les voies métaboliques par lesquelles cheminent les signaux d'activation et d'inhibition à l'intérieur des cellules NK sont moins connues que celles qui ont cours dans les lymphocytes T et B. Chose certaine, les molécules de la famille Ly49 jouent un rôle déterminant dans la spécificité

des cellules NK en contribuant à la constitution de leur répertoire. De fait, à l'époque où ce projet a débuté, seulement 9 des membres de la famille Ly49 étaient connus (Ly49A-I). Aujourd'hui, plus de 23 gènes pouvant coder pour une molécule Ly49 ont été identifiés (*Ly49a-w*) et plusieurs équipes s'entendent sur le fait que cette famille serait vraisemblablement encore plus vaste.

L'expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs n'est pas exclusive aux cellules NK. En effet, elle est aussi retrouvée à la surface, notamment, de certaines sous-populations de cellules T qui sont restreintes par CD1d, nommées NKT ainsi qu'à la surface de cellules T CD8⁺ mémoires. Plusieurs études suggèrent que les NKR puissent jouer un rôle dans les différentes réponses immunes pour lesquelles les lymphocytes T sont des effecteurs cellulaires majeurs : notamment les réponses antivirales et antitumorales. Mais comment réconcilier le fait que des récepteurs Ly49 inhibiteurs et des récepteurs d'activation des cellules T (TCR) qui sont tous les deux spécifiques de molécules du CMH-I, puissent être exprimés à la surface d'une même cellule? Quelles sont les fonctions des lymphocytes T que les récepteurs Ly49 régulent? Quels sont les facteurs qui modulent la capacité de signalisation de ces récepteurs? Quel est le rôle des cellules qui expriment les récepteurs Ly49, par exemple, lors d'une infection virale? Ce ne sont là que quelques-unes des questions prédominantes actuelles et auxquelles nous avons tenté de répondre lors de ce projet de doctorat.

Voici comment cette thèse est structurée. Le premier chapitre passe en revue les grandes lignes des connaissances acquises concernant les récepteurs de la famille Ly49 exprimés à la surface des cellules NK et des cellules T et les situe dans le contexte général des récepteurs de type NK (NKR). Quelques-uns des questionnements et des modèles hypothétiques relatifs aux rôles biologiques de ces récepteurs y sont présentés. Les résultats obtenus lors de mon projet de doctorat sont présentés sous forme de trois chapitres constitués, respectivement, des trois articles se rapportant aux différents volets de ce projet. Deux de ces articles sont déjà parus dans des revues avec comités de lecture. Le troisième, a été soumis pour publication au mois de mars dernier au journal

“Immunology” et est actuellement en révision. Ces articles sont reproduits intégralement dans leur version originale anglaise. Chacun des articles est précédé d’une courte introduction permettant de bien en situer le contexte au moment où nous avons débuté les travaux, ainsi que d’une traduction française du résumé original. Finalement, le dernier chapitre est constitué d’une discussion générale. Cette dernière reprend les principaux résultats que nous avons obtenus et qui sont discutés en parallèle avec ceux récemment publiés par d’autres équipes. Il est important de noter que dans l’ensemble, je réfère presque uniquement aux NKR murins afin de circonscrire le contexte de l’argumentation.

Avant-propos

Afin que le lecteur puisse évaluer ma contribution personnelle aux travaux rapportés dans cette thèse, voici le détail de la contribution de chacun des auteurs des trois articles qui en constituent la partie expérimentale. Deux des trois articles présentés sont déjà parus. Le troisième article vient d'être soumis pour publication. Les docteurs Suzanne Lemieux et Pascale Duplay ont respectivement agi en tant que directrice et de codirectrice de ces travaux. De plus, il est à noter que le docteur Silvia Vidal, de l'université McGill, a été une collaboratrice de premier plan lors des travaux abordés dans le deuxième chapitre de cette thèse. Par leur encadrement scientifique, elles ont toutes trois permis la réalisation des travaux présentés ici, et sont, par conséquent, les auteures seniors des publications qui en découlent. Outre les articles présentés dans la thèse (Annexe E), les résultats obtenus dans ce programme de recherche ont fait l'objet de plusieurs communications dont la liste est présentée à l'Annexe F.

Article I

Assessment of *Cmv1* candidates by genetic mapping and *in vivo* antibody depletion of NK cell subsets.

Madame Catherine Paré avait, lors de sa maîtrise dans le laboratoire du Dr Suzanne Lemieux, produit et caractérisé l'AcMo 5GA5 qui nous a permis de cibler la population Ly49C/I⁺ lors de cette étude. Monsieur Seung-Hwan Lee faisant partie du laboratoire du Dr Silvia Vidal, a pour sa part, collaboré à la cartographie génétique. Madame Chantal Depatie effectuait un doctorat à l'Université McGill sous la direction du Dr Vidal au moment de ces travaux et est co-première auteure de cette publication. En effet, les travaux rapportés dans cette publication ont été effectués à contribution égale de la part de madame Chantal Depatie et de moi-même. Madame Depatie a réalisé l'ensemble de la cartographie génétique et a effectué la mesure des titres infectieux permettant d'établir le phénotype de résistance virale des souris. Pour ma part, j'ai effectué la production et la purification des AcMo nécessaires à l'étude, la mise au point des expériences de déplétion *in vivo*, les isollements de cellules NK ainsi que leur analyse par cytométrie en flux. Les deux co-premières auteures ont travaillé en équipe pour les manipulations animales (injections, prélèvements et traitements des organes). La rédaction de l'article a été

effectuée de façon conjointe par les co-premières auteures et leurs directrices de recherche, les Dr Suzanne Lemieux et Silvia Vidal.

Article II

Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with TCR-mediated activation.

Madame Joanne Roger a produit les vecteurs d'expression et les tous premiers clones ayant permis la mise au point technique initiale du projet et a participé aux différents travaux. Tous les résultats présentés dans cette publication sont issus de travaux que j'ai moi-même effectués. Ceci inclut la mise au point du système de stimulation par le SEE ("Staphylococcal Enterotoxin E") ainsi que la construction et la caractérisation d'une banque de clones de cellules T exprimant des niveaux variables des récepteurs Ly49A et Ly49C. La rédaction de cet article a été réalisée grâce au travail conjoint des directrices de recherche, les Dr Suzanne Lemieux et Pascale Duplay ainsi que de moi-même.

Article III

Ly49A inhibits TCR/CD3-induced apoptosis and IL-2 secretion.

Dans ce troisième article, j'ai participé à un niveau moindre puisque la majorité des résultats présentés sont le fruit des travaux effectués par madame Joanne Roger. J'ai effectué les travaux impliquant la stimulation des cellules effectrices à l'aide des ligands naturels du TCR et du récepteur Ly49A. J'ai aussi participé aux discussions scientifiques concernant l'analyse des résultats obtenus ainsi qu'à la préparation des figures du manuscrit. La définition du projet ainsi que la totalité des expériences ont été réalisées sous la direction du Dr Duplay.

Chapitre 1 :

Revue Bibliographique

LES CELLULES NK

Découverte

Les cellules NK ont été découvertes grâce à leur propriété de lyser spontanément certaines lignées de cellules tumorales, surtout de nature hématopoïétique (Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975). Ne nécessitant aucune présensibilisation et n'étant pas restreinte par les molécules du CMH de classe I, comme c'est le cas pour les lymphocytes T, cette propriété antitumorale innée fut nommée "activité cytotoxique naturelle" ou "activité NK". Étant caractérisées par l'absence des récepteurs spécifiques d'antigènes des lymphocytes T (TCR) et B (BCR), les cellules NK ont même porté le nom de "cellules nulles" (non-T et non-B) à une certaine époque (Niaudet *et al.*, 1979). On sait maintenant qu'elles sont d'importants effecteurs de la surveillance contre les infections et les tumeurs et que les molécules du CMH-I régulent leurs fonctions.

Propriétés

Les cellules NK murines sont de phénotype CD3⁻ CD4⁻ CD8⁻ TCR⁻ CD16⁺ (FcγRIIIA) CD122⁺ (Interleukine(IL)-2/IL-15Rβ). Ces cellules possèdent un cytoplasme abondant contenant des granules azurophiles, d'où l'appellation de grands lymphocytes granuleux. Les cellules NK représentent de 5 à 15% des lymphocytes circulants et environ 3% des lymphocytes spléniques. Elles sont aussi présentes dans les poumons, le système gastro-intestinal, le foie et l'utérus (Whitelaw et Croy, 1996).

L'activité biologique d'une cellule NK s'effectue soit par la lyse de cellules cibles ou soit par la sécrétion de lymphokines qui sont impliquées dans les communications intercellulaires et qui modulent le développement de l'immunité acquise subséquente. Les cellules NK peuvent être activées par certaines cytokines (IL-12, IL-15, IL-18, interféron (IFN) α/β, TNF-α) produites très tôt lors de certaines infections. Ceci leur permet d'intervenir très rapidement dans les phases précoces d'invasion par des micro-organismes pathogènes par la sécrétion de cytokines (IFNγ, IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF, TNF-α) et de chimiokines (MIP-1α, RANTES, IL-18) (revu par Biron *et al.*, 1999).

En présence d'IL-12, les cellules NK (nommées NK1 chez l'homme) synthétisent majoritairement de l'IFN γ ainsi que de l'IL-10, ce qui leur permet d'induire une réponse immunitaire de type Th1 qui se caractérise notamment par un recrutement et une activation des macrophages; il s'agit d'une attaque dirigée contre les pathogènes intracellulaires (Scott et Trinchieri, 1995; Scharon-Kersten et Sher, 1997; Peritt *et al.*, 1998). En présence d'IL-4, les cellules NK (nommées NK2 chez l'homme) synthétisent de l'IL-5 et de l'IL-13 et induisent une réponse de type Th2 caractérisée par la production d'une réponse humorale; une réponse immunitaire davantage dirigée contre les pathogènes extracellulaires. Notons que l'IL-2 peut aussi promouvoir la prolifération et l'activation des cellules NK (Trinchieri, 1989; Peritt *et al.*, 1998), mais cet effet est mineur dans le cadre d'une réponse immune innée puisque l'IL-2 est synthétisée subséquentement à la réponse NK (revu par Biron *et al.*, 1999). Finalement, les cellules NK semblent détruire leurs cibles davantage via l'exocytose granulaire. Toutefois, elles expriment aussi FasL ("Fas Ligand" ou CD95L) et TRAIL ("TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand"), des protéines qui peuvent enclencher l'apoptose des cellules cibles exprimant leurs récepteurs respectifs (Zamai *et al.*, 1998; Takeda *et al.*, 2001).

Modes de reconnaissance

Hypothèse de la reconnaissance de "l'absence du soi"

Il y a plus de 30 ans, on observait que les molécules du CMH de classe I régissaient à la fois la résistance naturelle face aux tumeurs et le rejet de greffes de moelle osseuse (Cudkowicz et Bennett, 1971). Aussi, il avait été rapporté que les cellules NK étaient aptes à éliminer des cellules lymphoïdes allogéniques dérivées de la moelle osseuse (Kiessling *et al.*, 1977; Klein *et al.*, 1978). Étant donné que les cellules NK n'expriment pas de TCR, on croyait qu'elles n'étaient pas restreintes par les molécules du CMH-I comme les lymphocytes T cytotoxiques et il a fallu plusieurs années avant que l'on évalue le rôle que pouvaient avoir les molécules du CMH-I dans la régulation de l'activité NK. En 1986, une équipe observe que le niveau de susceptibilité de certaines lignées tumorales à la lyse par les cellules NK est en corrélation inverse avec la quantité de molécules du

CMH-I qu'elles expriment (Karre *et al.*, 1986). Suite à ces observations, Ljunggren et Kärre suggèrent en 1990 l'hypothèse de la reconnaissance de "l'absence du soi" selon laquelle les cellules NK auraient notamment comme fonction de reconnaître et d'éliminer les cellules exprimant des niveaux réduits de molécules du CMH-I de l'hôte (soi) (Ljunggren et Karre, 1990). L'habilité de ces molécules à prévenir la cytotoxicité NK a été démontrée dans plusieurs modèles expérimentaux : i) les cellules d'origines parentales sont rejetées chez des souris hybrides puisqu'elles n'expriment pas le répertoire complet des molécules du CMH-I de ces souris (modèle de la "résistance hybride", Bennett, 1987; Cudkowicz et Bennett, 1971); ii) les cellules NK sont capables de distinguer les cellules H-2^{-/-} des cellules H-2^{+/+}, preuve de l'existence d'un mécanisme d'élimination sélectif (Ljunggren *et al.*, 1988); iii) l'élimination de cellules tumorales reliée à une chute du niveau d'expression des molécules du CMH-I est abrogée suite à la déplétion des cellules NK (Trinchieri, 1989) et iv) la transfection des gènes de la β_2 -microglobuline (β_2m) ou de molécules du CMH-I dans une lignée cellulaire $\beta_2m^{-/-}$, restaure à la fois l'expression des molécules du CMH-I à la surface cellulaire et la résistance envers la cytotoxicité NK (Sturmhofel et Hammerling, 1990; Lohwasser *et al.*, 1999). En définitive, tout mécanisme diminuant ou prévenant l'expression des molécules du CMH-I, ou encore altérant leur nature, ferait obstacle à leur reconnaissance par les cellules NK et rendrait les cellules affectées sensibles à l'activité cytotoxique NK. L'ensemble de ces observations suggère que les cellules NK s'adaptent aux variations d'identité des cellules de l'hôte de façon à éliminer les cellules chez qui elles dénotent l'absence d'une des molécules du CMH-I du soi, tout en manifestant une tolérance envers les cellules saines, évitant ainsi l'auto-immunité. L'exemple le plus éloquent de la validité du modèle de la reconnaissance de "l'absence du soi" vient de la démonstration que les cellules NK des souris TAP^{-/-}, $\beta_2m^{-/-}$ et TAP^{-/-}/ $\beta_2m^{-/-}$ ne lysent pas les cellules syngéniques CMH-I^{-/-}, contrairement aux cellules NK des lignées parentales respectives (Karre *et al.*, 1986; Ljunggren et Karre, 1990; Bix *et al.*, 1991; Hoglund *et al.*, 1991).

Le mécanisme moléculaire expliquant la théorie de la reconnaissance de "l'absence du soi" a été établi suite à l'identification de récepteurs capables d'inhiber les fonctions NK

lors de leur engagement avec une molécule du CMH-I. Toutefois, afin que la théorie de la reconnaissance de "l'absence du soi" tienne, il faut que toutes les cellules NK expriment au minimum un récepteur d'inhibition ayant comme ligand une molécule de l'hôte. Les résultats d'analyses de cellules NK murines et humaines individuelles confirment cette théorie (Valiante *et al.*, 1997; Kubota *et al.*, 1999b; Takei *et al.*, 2001).

Modèle des "deux récepteurs"

La présence de récepteurs d'inhibition spécifiques des molécules du CMH-I à la surface des cellules NK n'explique que partiellement l'hypothèse de la reconnaissance de "l'absence du soi". En effet, l'absence de molécules du CMH-I ne peut à elle seule expliquer l'enclenchement de l'activité cytotoxique NK puisque certaines cellules, comme les globules rouges, demeurent résistantes à cette attaque (Karlhofer *et al.*, 1992). En 1993, Yokoyama propose le modèle des "deux récepteurs" selon lequel les cellules NK posséderaient deux types de récepteurs à activités antagonistes : les récepteurs d'inhibition et les récepteurs d'activation (Yokoyama, 1993). Ainsi, même en absence de ligands de récepteurs d'inhibition, une cellule donnée pourrait demeurer résistante à l'action des cellules NK en autant qu'elle ne possède aucun ligand de récepteurs d'activation. Une telle situation pourrait se présenter par exemple, si le(s) récepteur(s) d'activation des cellules NK sont spécifiques de ligand(s) dont l'expression est induite lors d'une transformation ou d'une infection. Il y aurait donc deux niveaux de régulation. Lors de leur engagement avec leurs ligands, les récepteurs d'inhibition préviendraient l'enclenchement des mécanismes cytotoxiques des cellules NK envers les cellules autologues normales de l'hôte. En effet, le signal d'inhibition provenant de la reconnaissance du soi domine généralement celui provenant de cascades signalétiques d'activation (Burshtyn *et al.*, 1996; Valiante *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1997). Toutefois, il est important de noter que dans certaines circonstances, le signal provenant d'un récepteur d'inhibition peut être surpassé et donc, que la présence de l'activité des récepteurs d'inhibition NK n'est pas absolue (Litwin *et al.*, 1993; Lanier *et al.*, 1997). Puisque plusieurs types d'interactions récepteurs/ligands sont en jeu, la résultante de la somme des deux types de signaux déterminerait l'état d'activation de la cellule NK et par

le fait même, le sort de la cellule cible reconnue (revu par Brumbaugh *et al.*, 1998; Tomasello *et al.*, 2000a). La probabilité que la puissance du signal généré par un récepteur soit suffisante pour atteindre le niveau seuil lui permettant d'engendrer une conséquence fonctionnelle, dépendrait de l'avidité de l'interaction récepteur/ligand. L'avidité, définie comme étant la force totale de la liaison entre deux molécules, est déterminée par la somme du niveau d'expression de chacune des deux molécules et de l'affinité qu'elles ont l'une envers l'autre. L'abaissement d'un de ces paramètres affecterait donc la puissance du signal transmis par ce récepteur. Il a été démontré que la force d'adhésion de cellules exprimant un certain récepteur envers des cellules cibles données est en corrélation avec la quantité de ligands accessibles qu'il reconnaît (Daniels *et al.*, 1994a; Kane, 1994). Plusieurs études suggèrent que le niveau d'expression (ou d'accessibilité) de ce récepteur ou de son ligand, détermine sa capacité d'inhiber différentes fonctions des cellules NK, telles l'activité lytique (Nakamura *et al.*, 1997; Sivakumar *et al.*, 1997; Hoglund *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 2001; Silver *et al.*, 2000; Silver *et al.*, 2001) ou la synthèse de cytokines (Kim et Yokoyama, 1998; Kambayashi *et al.*, 2001). L'équipe de Sentman va plus loin en démontrant que le niveau d'expression du récepteur détermine le niveau de ligands nécessaire pour qu'une cellule cible puisse éviter la lyse par les cellules NK (Olsson *et al.*, 1995; Olsson-Alheim *et al.*, 1997). Par exemple, une cellule NK ayant un faible niveau de récepteurs d'inhibition nécessitera un niveau d'expression plus élevé de ligands en surface de la cellule cible reconnue, pour réussir à générer un signal qui mènera à l'inhibition de l'activité NK. Ainsi, cette cellule effectrice est plus sensible à détecter une cellule cible présentant des niveaux réduits de ligands, puisqu'une chute de moins grande amplitude est suffisante à enclencher son activité lytique.

Rôles biologiques des cellules NK

Par leur action rapide, les cellules NK agissent en complémentarité avec les lymphocytes T qui eux nécessitent une période de stimulation et de prolifération pour devenir des effecteurs immunitaires efficaces. Comme le stipule l'hypothèse de la reconnaissance de "l'absence du soi", les cellules NK pourraient effectivement compléter l'action des

cellules T en supprimant les cellules infectées et tumorales qui réussissent à échapper à la surveillance des lymphocytes T par le biais d'une anomalie concernant l'expression de leurs molécules du CMH-I. L'incidence élevée de tumeurs et d'infections virales chez les souris déficientes en cellules NK est en accord avec cette hypothèse (Trinchieri, 1989; Vargas-Cortes *et al.*, 1992). D'ailleurs, les cellules NK sont aussi reconnues pour l'importance de leur rôle dans les défenses immunitaires contre certaines infections par des micro-organismes à développement intracellulaire telles les bactéries *Listeria monocytogenes* et *Mycobacterium Bovis* (BCG) (Unanue, 1997; Brawand *et al.*, 2000), les parasites *Toxoplasma gondii* et *Leishmania major* (Scharton-Kersten et Sher, 1997) et les virus ectromélie et MCMV (Delano et Brownstein, 1995) (revu par Biron *et al.*, 1999).

Les cellules NK semblent aussi être importantes dans le contexte des transplantations de moelle osseuse puisqu'elles peuvent rejeter les cellules hématopoïétiques allogéniques. Les premières preuves démontrant que les cellules NK sont capables d'alloréactivité proviennent d'études de greffes de moelle osseuse effectuées chez des souris histoincompatibles (Kiessling *et al.*, 1977; Bennett *et al.*, 1987). Cette réaction de rejet est attribuée soit à l'absence des molécules du CMH-I du soi sur la greffe (hypothèse de la reconnaissance de "l'absence du soi") et/ou soit à un récepteur d'activation qui reconnaît la présence d'un ligand allogénique.

On a toujours pensé que le rôle joué par les cellules NK dans la réponse immune était essentiellement cytotoxique. Toutefois, on ne connaît pas encore l'importance physiologique que cette fonction peut avoir. D'ailleurs, de plus en plus d'observations *in vivo* suggèrent que la synthèse de cytokines de la part des cellules NK serait critique dans les processus de résistance anti-virales et anti-tumorales. À titre d'exemple, les souris déficientes pour l'IFN γ (majoritairement synthétisée par les cellules NK) montrent une susceptibilité accrue face à MCMV, *Listeria monocytogenes* et *Toxoplasma gondii* (revu par Miller, 2002). *In vitro*, il a été démontré que la présence de cytokines, de cellules infectées ou transformées et que l'engagement de certains NKR activateurs (voir les sections "Les récepteurs des cellules NK" et "Rôles des récepteurs Ly49 exprimés à la

surface des cellules NK”) induisent la prolifération, la synthèse de cytokines et l'activité cytotoxique des cellules NK. Toutefois, il demeure difficile d'étudier les fonctions NK et les récepteurs impliqués de par le manque de modèles *in vivo* et d'outils permettant de les identifier spécifiquement. À ce jour, seule l'équipe de Yokoyama a pu générer une lignée de souris qui semble être déficiente uniquement pour les cellules NK; ses travaux confirment le rôle anti-tumoral des cellules NK ainsi que leur capacité à synthétiser de grandes quantités d'IFN γ en réponse à une infection (Kim *et al.*, 2000). D'autre part, plusieurs équipes ont observé une chute du taux de cellules NK et de leur activité cytotoxique chez les patients cancéreux (revu par Miller, 2002). Ceci pourrait être explicable notamment par la stimulation par un antigène tumoral, d'un récepteur activateur des cellules NK qui mènerait à l'épuisement de leur réponse ou encore qui induirait leur mort par apoptose (Mason *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 1998), ou par la stimulation d'un récepteur inhibiteur qui pourrait interférer avec leurs différentes fonctions (voir les modèles de “l'échappement aux cellules NK” et de “l'inhibition indirecte des cellules NK” dans la section “Stratégies d'échappement du CMV au système immunitaire”), ou par un certain déficit quantitatif ou fonctionnel des cellules NK chez ces individus.

LES RÉCEPTEURS DES CELLULES NK

Puisque la fonction des cellules NK est de reconnaître l'absence de molécules du CMH-I, il existe obligatoirement un mécanisme indépendant de la reconnaissance de ces molécules et qui permet l'activation des cellules NK. Aucun récepteur unique n'a encore été identifié comme étant responsable de l'initiation de la cytotoxicité naturelle des cellules NK envers leurs cellules cibles. Une hypothèse envisagée serait que la combinaison de plusieurs récepteurs pourrait être responsable d'enclencher les différentes fonctions NK. D'ailleurs, il est très important de noter que la plupart des récepteurs inhibiteurs des familles présentées ici possèdent une contrepartie activatrice. Le rôle biologique de ces récepteurs activateurs est inconnu, d'autant plus que plusieurs sont exprimés par toute une panoplie de cellules immunitaires autres que les cellules NK telles

les cellules présentatrices d'antigènes (CPA : les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques), les leucocytes, les lymphocytes T et B (revu par Ryan *et al.*, 2001).

Les récepteurs impliqués dans la régulation des fonctions des cellules NK sont codés par différentes familles de gènes dont la plupart sont regroupées dans différents complexes génétiques (revu par Barten *et al.*, 2001).

Les cellules NK humaines expriment notamment les récepteurs de la famille KIR ("Killer-cell Inhibitory Receptors") qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ce sont des protéines transmembranaires de type I. Les KIR reconnaissent les molécules HLA ("Human Leukocyte Antigen") de classe I classiques nommées classe Ia. c'est à dire HLA-A, HLA-B et HLA-C. Ces récepteurs ont une spécificité dite "dégénérée" puisqu'ils reconnaissent individuellement plusieurs molécules ou allèles du CMH-I. Ces récepteurs aussi exprimés à la surface de sous-populations de lymphocytes T, se retrouvent uniquement chez l'homme (revu par Long *et al.*, 2001 ainsi que par Nakamura et Seaman, 2001).

La majorité des cellules NK humaines et murines expriment des récepteurs CD94/NKG2. Ce sont des protéines transmembranaires de type II apparentées aux lectines de type C. La plupart de ces récepteurs sont des hétérodimères constitués de la chaîne invariable CD94 qui s'associe à différents membres de la famille NKG2. CD94 ne possède pas de domaine cytoplasmique et donc ne peut transmettre un signal par lui-même. Ce serait donc la chaîne NKG2 associée qui serait responsable de l'activité fonctionnelle du récepteur hétérodimérique (revu par O'Callaghan, 2000). Par exemple, les récepteurs CD94/NKG2A et CD94/NKG2C se lient au même ligand mais leur engagement respectif met en route des cascades de signalisation d'inhibition et d'activation et ce, à cause de différentes structures de leurs domaines cytoplasmiques. Chez l'humain, le ligand de ces récepteurs est la molécule de classe Ib (molécules du CMH-I non-classiques) HLA-E. Son expression à la surface cellulaire dépend de l'ancrage dans sa niche peptidique d'un nonapeptide issu d'une portion du peptide signal clivé à partir de la chaîne α de la plupart

des molécules de classe Ia (Lee *et al.*, 1998; Brawand *et al.*, 2000). D'ailleurs, son expression est en corrélation avec la disponibilité des peptides signal; la diminution de production de ceux-ci, suite à des processus affectant la synthèse d'une ou de plusieurs molécules de classe Ia, affectera le niveau d'expression de HLA-E et par conséquent la capacité de ces molécules à initier la production d'un signal via CD94/NKG2 (Braud *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'expression de HLA-E à la surface de cellules cibles est suffisante pour contrer l'activité de cellules NK exprimant CD94/NKG2A ou pour enclencher l'activité de cellules NK exprimant CD94/NKG2C (Braud *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998). Donc, l'expression d'un récepteur CD94/NKG2 inhibiteur à la surface des cellules NK jouerait un rôle très important puisqu'il permettrait à ces cellules de vérifier l'intégrité de l'expression de la majorité des molécules polymorphiques du CMH-I (revu par Lopez-Botet *et al.*, 2001). Il est important de noter que chez la souris, CD94/NKG2 interagit avec la molécule de classe Ib, Qa-1^b, qui est l'homologue fonctionnel de HLA-E (Salcedo *et al.*, 1998; Vance *et al.*, 1998).

La séquence des différents nonapeptides pouvant se nicher dans HLA-E présente un léger polymorphisme qui d'ailleurs influence l'affinité avec laquelle CD94/NKG2 interagit (Llano *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 1999). Tel qu'il a été observé pour les contreparties activatrices des KIR, le récepteur CD94/NKG2C activateur reconnaît HLA-E avec une affinité inférieure à celle du récepteur CD94/NKG2A inhibiteur (Llano *et al.*, 1998; Vales-Gomez *et al.*, 1999). Ceci pourrait expliquer pourquoi le signal d'inhibition provenant de la reconnaissance du soi domine généralement celui provenant de cascades signalétiques d'activation.

La mise en culture de cellules NK humaines et murines, en présence de cytokines, induit l'expression des récepteurs CD94/NKG2 de telle sorte qu'ils se retrouvent à la surface de 90% de ces cellules (Yu *et al.*, 1998; Toomey *et al.*, 1999). Chez la souris, la proportion de cellules NK exprimant un récepteur CD94/NKG2 diminue avec l'âge : 60% des cellules NK néonatales expriment CD94/NKG2A, comparativement à 35% chez l'adulte (Dorfman et Raulet, 1998; Kubota *et al.*, 1999b; Takei *et al.*, 2001). Puisque la majorité

des cellules NK expriment CD94/NKG2A dès la naissance et que son engagement dépend indirectement de l'expression de la plupart des molécules du CMH-I. il a été proposé qu'il prévienne l'auto-immunité de ces cellules face aux cellules de l'hôte (Salcedo *et al.*, 1998; Sivakumar *et al.*, 1999). Toutefois, cette hypothèse serait contestée par l'observation récente d'une lignée de souris qui n'exprime pas de façon naturelle CD94 et par le fait même, n'exprime pas non plus les récepteurs CD94/NKG2, et qui ne présente aucun signe pathologique (Vance *et al.*, 2002). Pour sa part, le récepteur CD94/NKG2C activateur ne se retrouve que sur 4% des cellules NK matures (Takei *et al.*, 2001). Finalement, il est important de mentionner qu'une faible portion de lymphocytes T expriment aussi NKG2A et que ce point est développé plus loin (Carena *et al.*, 1997; Le Drian *et al.*, 1998).

Contrairement aux autres membres de cette famille, NKG2D ne forme pas d'hétérodimères avec CD94, mais forme plutôt des homodimères. Ce récepteur s'associe à la protéine adaptatrice DAP10 (plutôt qu'à DAP12 comme le font les récepteurs d'activation NKG2C et NKG2E), qui possède un site de recrutement pour la phosphatidylinositol 3-kinase capable d'enclencher une cascade d'activation (Wu *et al.*, 1999). L'engagement de NKG2D induit, via DAP10, l'activation non seulement des cellules NK, mais aussi celle des lymphocytes T cytotoxiques et des macrophages activés (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 1999; Diefenbach *et al.*, 2000; Groh *et al.*, 2001). Fait intéressant, NKG2D humain aurait entre autres comme ligands les ULBP ("UL16-Binding Protein") 1 et 2 qui sont exprimées sur plusieurs types cellulaires et tissulaires (Cosman *et al.*, 2001), ainsi que les protéines MIC ("MHC class I Chain-related") A et B, qui sont faiblement exprimées sur les cellules épithéliales intestinales, mais dont l'expression est induite sur les tumeurs épithéliales et les cellules infectées par le CMV (Groh *et al.*, 1996; Bauer *et al.*, 1999; Groh *et al.*, 2001). Chez la souris les ligands de NKG2D sont H-60 (antigène d'histocompatibilité mineur) et RAE-1 ("Retinoic Acid Early inducible gene") qui, comme son nom l'indique, est induit par l'acide rétinoïque (Cerwenka *et al.*, 2000). La famille RAE-1 comporte plusieurs isoformes (Nomura *et al.*, 1994). Ces molécules sont rarement exprimées sur les tissus adultes sains,

mais souvent retrouvées à la surface des lignées tumorales (Cerwenka *et al.*, 2000; Diefenbach *et al.*, 2000). Bien qu'elles ne s'associent pas à la β_2m et qu'elles soient incapables de présenter des peptides, toutes ces molécules présentent une faible, mais réelle homologie avec les molécules du CMH-I (revu par Sutherland *et al.*, 2001). Malgré que l'on ait pu cristalliser la molécule NKG2D, on ne comprend toujours pas comment elle peut lier autant de ligands aussi peu homologues entre eux (Wolan *et al.*, 2001). Outre le CMV, nous ne savons pas si d'autres micro-organismes peuvent induire l'expression des ULBP et MIC (Groh *et al.*, 2001). Cependant, il est important de noter que l'engagement de NKG2D (exprimé sur la majorité des cellules NK) par ces molécules, engendre un signal d'activation dominant par rapport aux signaux que peuvent engendrer les récepteurs d'inhibition des cellules NK spécifiques des molécules du CMH-I du soi (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 1999; Diefenbach *et al.*, 2000; Cosman *et al.*, 2001; Kubin *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2002). Donc, l'expression des ligands de NKG2D pourrait servir de "signal de détresse" aux cellules de l'hôte qui sont en péril en activant l'immunité antivirale des cellules NK et T (revu par Sutherland *et al.*, 2001).

Plusieurs autres récepteurs d'activation ont récemment été identifiés à la surface des cellules NK humaines tels 2B4, NKp30, NKp44 et NKp46 (revu par Biassoni *et al.*, 2001). Cependant, les ligands de plusieurs de ces récepteurs demeurent inconnus. Toutefois, il est intéressant de noter que certains d'entre eux semblent être impliqués dans la reconnaissance d'infections virales (revu par Moretta *et al.*, 2001). Par exemple, NKp44 et NKp46 aurait comme ligand l'hémagglutinine de certains virus (Arnon *et al.*, 2001; Mandelboim *et al.*, 2001; Mandelboim et Porgador, 2001). Aussi, 2B4 reconnaît la molécule CD48 (Brown *et al.*, 1998; Latchman *et al.*, 1998) dont l'expression est fortement régulée à la hausse à la surface des cellules infectées par le EBV (revu par Thorley-Lawson *et al.*, 1993).

Le terme LIR ("Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor") désigne une famille de récepteurs apparentés aux immunoglobulines qui sont exprimés surtout à la surface des lymphocytes B, des monocytes et des cellules dendritiques, mais aussi à la surface d'une

faible proportion de cellules NK et de cellules T (Borges *et al.*, 1997; Cosman *et al.*, 1997; Leong *et al.*, 1998). Trois différents groupes de molécules LIR ont été identifiés; certaines possèdent dans leur domaine cytoplasmique des motifs de signalisation propres aux récepteurs de type inhibiteur, certaines possèdent des propriétés propres aux récepteurs d'activation et d'autres sont sécrétées (Nakajima *et al.*, 1999). Les formes inhibitrices LIR-1 et LIR-2 auraient comme ligands les molécules du CMH-I HLA-A, -B, -C, -G, contrairement aux récepteurs KIR qui lient soit HLA-A, ou -C. Il semblerait que certaines des molécules LIR puissent reconnaître des protéines virales (revu par Ravetch et Lanier, 2000).

Chez la souris, trois différents types de récepteurs appartenant à des familles de protéines apparentées aux lectines de type C sont exprimés à la surface des cellules NK : NKR-P1(A-F), CD94/NKG2(A-E) (déjà présentés dans la section précédente) et Ly49(A-W). La plupart des gènes qui codent ces récepteurs sont localisés dans le complexe de gènes nommé NKC ("NK gene complex") (Figure 1).

Parmi les molécules du NKC, la famille NKR-P1 a été l'une des premières identifiées (Yokoyama *et al.*, 1991). Les molécules NKR-P1B et NKR-P1D seraient des récepteurs d'inhibition (Carlyle *et al.*, 1999; Kung *et al.*, 1999), tandis que NKR-P1A, NKR-P1C et NKR-P1F seraient des récepteurs d'activation (Arase *et al.*, 1997; Plougastel *et al.*, 2001). NKR-P1E ne paraît pas pouvoir être exprimée puisque *Nkr-p1e* semble être un pseudogène (Plougastel *et al.*, 2001). La plus étudiée de toutes est la molécule NKR-P1C, communément nommée NK1.1. Puisqu'elle est exprimée à la surface de plus de 80% des cellules NK de la souris B6 (Koo et Peppard, 1984), on a longtemps cru qu'elle était une bonne candidate comme récepteur d'activation unique de ces cellules. Par ailleurs, certaines populations de lymphocytes T expriment aussi cette molécule (Bix et Locksley, 1995). Lors de son engagement avec un anticorps, NK1.1 initie l'exocytose granulaire, la cytotoxicité, la synthèse de cytokines et la prolifération des cellules NK

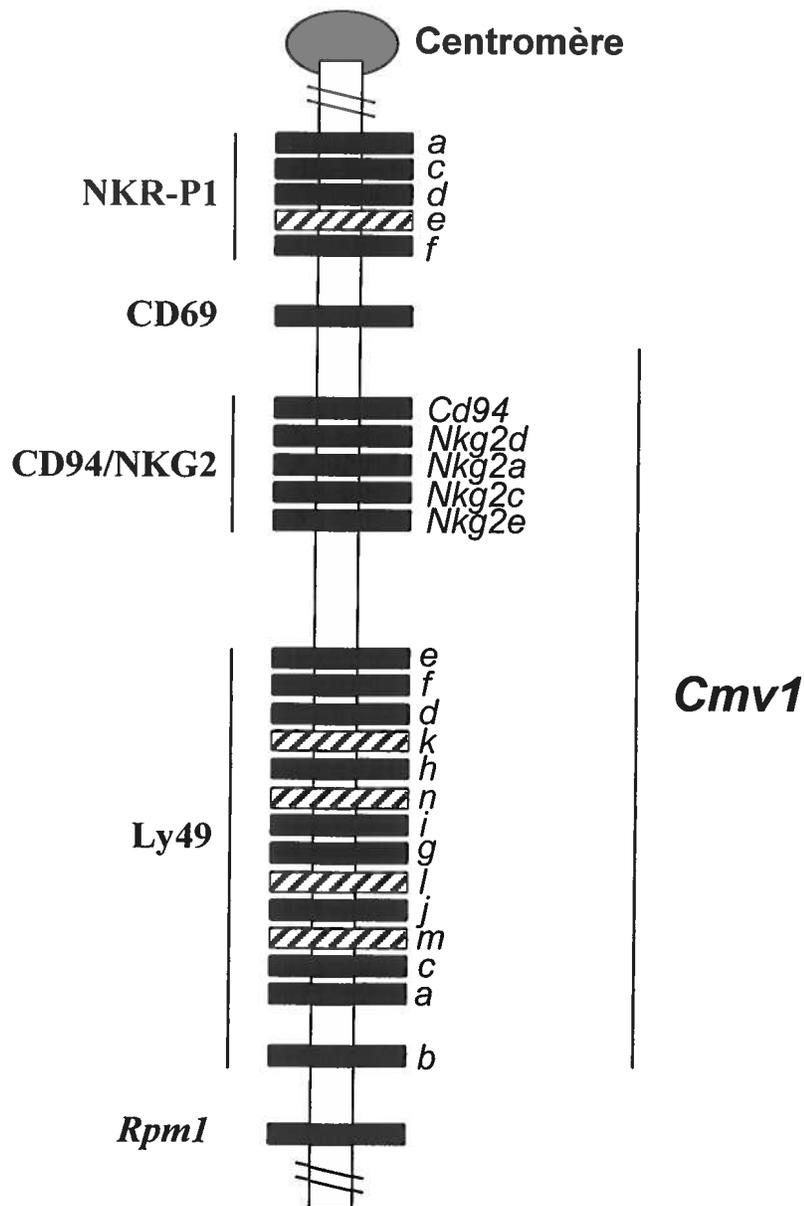


Figure 1 : Carte génétique du chromosome 6 murin dans la région du NKC.

Les positions génétiques relatives des unités de transcription sont indiquées par des boîtes noires. Les boîtes hachurées représentent des pseudogènes. La description des gènes *Cmv1* et *Rpm1* se trouve à la page 44 dans la section "*Cmv1*".

(Karlhofer et Yokoyama, 1991; Arase *et al.*, 1996; Kim et Yokoyama, 1998; Reichlin et Yokoyama, 1998). Il semble que l'absence d'expression de cette molécule à la surface des cellules NK se solde par une incapacité de détruire certaines lignées cellulaires tumorales (Ryan *et al.*, 1995) ou allogéniques (Kung et Miller, 1995). Le ligand et le rôle biologique de cette molécule demeurent toutefois inconnus.

Les récepteurs Ly49 sont exprimés en surface cellulaire sous forme d'homodimères dont les chaînes polypeptidiques sont reliées par des ponts disulfure (revu par Blery *et al.*, 2000). Ces récepteurs reconnaissent des molécules du CMH-I, tout comme les KIR chez l'humain. À ce jour, 23 gènes (*Ly49a-w*) codant pour des molécules appartenant à la famille des récepteurs Ly49 ont été identifiés chez la souris (revu par Anderson *et al.*, 2001). Chez les cellules NK humaines, un seul gène Ly49 (*Ly49l*) a été identifié. Toutefois, celui-ci semble être un pseudogène puisqu'il code pour une protéine dont le domaine apparenté au CRD ("Carbohydrate Recognition Domain") est tronqué (Westgaard *et al.*, 1998). Les propriétés des récepteurs Ly49 sont présentées en détails plus loin.

Cascades de signaux intracellulaires

L'engagement des différents récepteurs d'inhibition sur la cellule NK conduit à l'interruption de l'activité de lyse et de sécrétion de cytokines. Un même mécanisme d'action est partagé par tous ces récepteurs. En effet, ils se distinguent par la présence dans leur portion cytoplasmique, d'un ITIM ("Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif") qui se définit par la séquence consensus I/V/L/SxYxxL/V (Vivier et Daeron, 1997). L'engagement de ces récepteurs inhibiteurs engendre la phosphorylation des résidus tyrosine du ou des ITIM qu'ils possèdent (Figure 2) (D'Ambrosio *et al.*, 1995), ce qui permet le recrutement de protéines tyrosine phosphatase (PTP) possédant un domaine SH2 ("Src Homology 2 domain") telle SHP-1 ("SH2-containing Phosphatase-1") (D'Ambrosio *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1997; Motoda *et al.*, 2000) et/ou SHP-2 (Olcese *et al.*, 1996). Grâce à leur potentiel de déphosphorylation, celles-ci ont le pouvoir d'interrompre la cascade de signalisation induite par des récepteurs d'activation couplés à

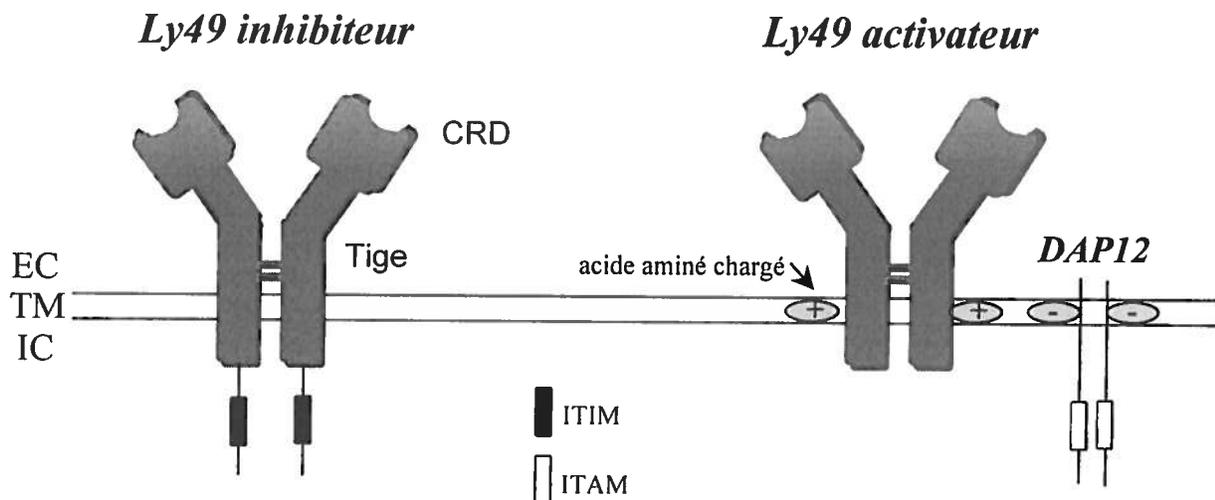


Figure 2 : Représentation schématique des récepteurs de la famille Ly49.

Les récepteurs Ly49 se présentent sous forme d'homodimères dont les chaînes peptidiques sont reliées par des ponts disulfure. Étant des protéines de type II, ces molécules ont leur extrémité amino-terminale dans la partie intracellulaire (IC). La portion extracellulaire (EC) est constituée d'un domaine de reconnaissance analogue à celui que les lectines utilisent pour reconnaître des sucres (CRD) ainsi que d'une tige. Grâce à la présence d'un acide aminé chargé dans leur portion transmembranaire (TM), les récepteurs Ly49 activateurs s'apparient à la protéine adaptatrice DAP12 par opposition de charges. DAP12 possède un ITAM qui lui permet de transmettre le signal d'activation à l'intérieur de la cellule (voir Figure 3). Les récepteurs Ly49 inhibiteurs sont caractérisés par la présence d'un ITIM dans leur portion IC. CRD, "Carbohydrate Recognition Domain"; EC, extracellulaire; IC, intracellulaire; ITAM, "Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif"; ITIM, "Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif"; TM, transmembranaire.

l'activité de protéines tyrosine kinases (PTK) (Figure 3). Même si plusieurs candidats ont été proposés, les substrats de SHP-1 demeurent inconnus. Ses cibles potentielles (directes ou indirectes) sont des protéines adaptatrices telles que LAT et SLP-76, ainsi que des protéines effectrices comme la PLC- γ ou les PTK ZAP-70 et p72^{Syk} (revu par Tomasello *et al.*, 2000b ainsi que par Ugolini et Vivier, 2000). Un point particulièrement important est que les récepteurs à ITIM fonctionnent par co-agrégation ce qui assurerait la spécificité de leur action uniquement envers les récepteurs d'activation co-engagés (Blery *et al.*, 1997; Renard *et al.*, 1997). La nécessité que ce co-engagement doive s'effectuer dans un environnement restreint expliquerait la capacité d'une même cellule NK de pouvoir simultanément discriminer différentes cellules cibles CMH-I⁺ ou CMH-I⁻ et détruire uniquement les dernières (Eriksson *et al.*, 1999a; Eriksson *et al.*, 1999b).

Pour ce qui est des récepteurs d'activation, ils sont dépourvus de motifs connus pouvant être impliqués dans la transduction de signal. Toutefois, ils possèdent un acide aminé chargé positivement dans leur portion transmembranaire qui leur permet de pouvoir s'associer par complémentarité de charges à des protéines membranaires chargées négativement telles, DAP10, DAP12, CD3 ζ ou FcR γ (Olcese *et al.*, 1997; Lanier *et al.*, 1998b; Mason *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000). Ce type de protéine spécialisée dans la transduction de signaux activateurs, possède un ITAM ("Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif") dans sa portion cytoplasmique (Lanier *et al.*, 1998a; Lanier *et al.*, 1998b). Ce motif est défini par un enchaînement YxxL/I(x)₆₋₈/YxxL/I, dont les résidus tyrosine sont phosphorylés suite à l'engagement du récepteur. Ce motif est une configuration d'ancrage particulière pour les domaines SH2 contenus dans les PTK de la famille Syk (Syk et ZAP-70) (Hatada *et al.*, 1995; McVicar *et al.*, 1998). L'activation de ces dernières entraîne une cascade signalétique qui se solde entre autres par la mobilisation de calcium intracellulaire, la synthèse de cytokines et l'induction de l'activité cytotoxique naturelle (Moretta *et al.*, 2001).

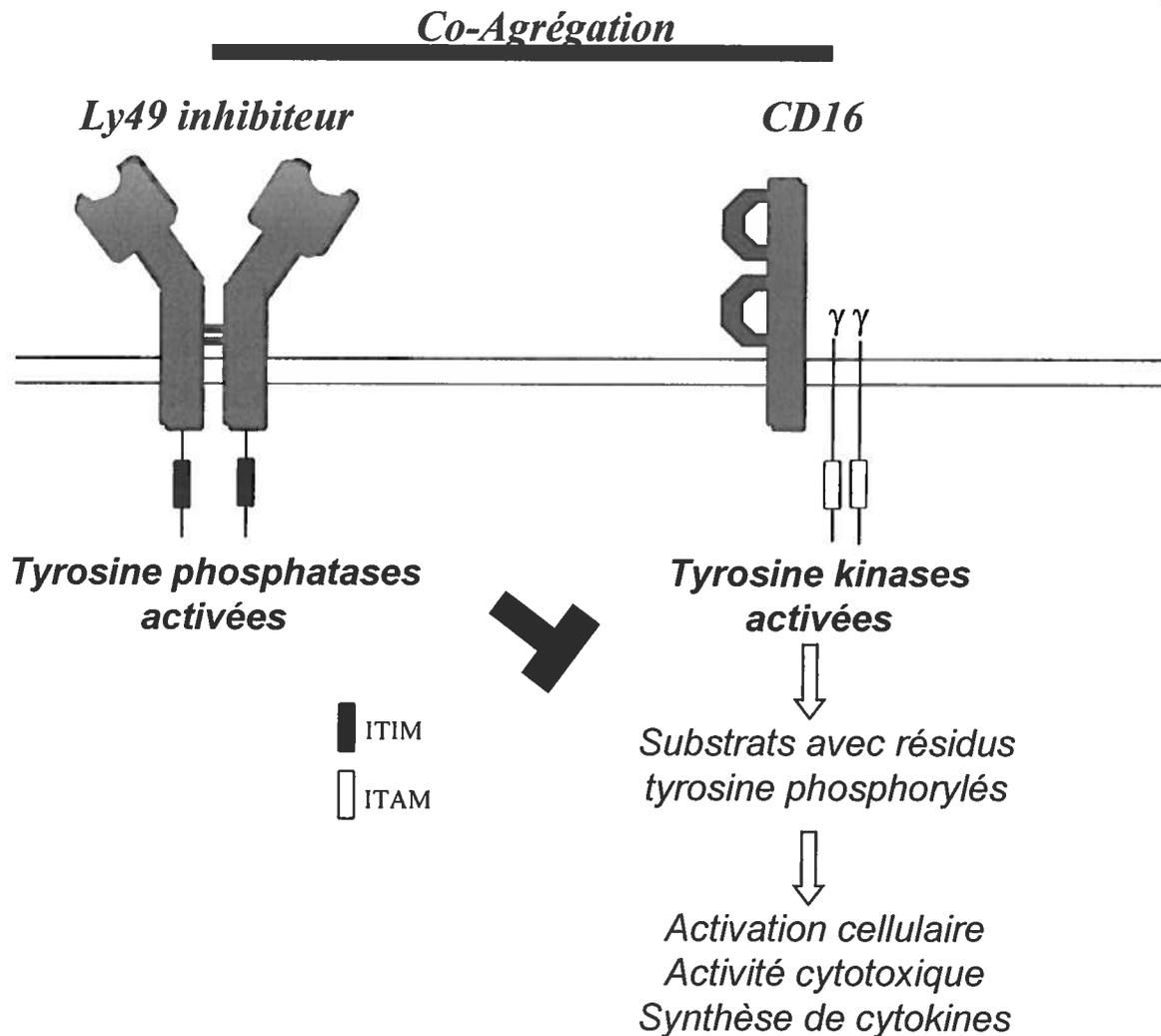


Figure 3 : Cascades de signaux intracellulaires initiées via des récepteurs des cellules NK.

L'engagement de CD16 (FcγRIIIA) induit une cascade de signaux d'activation. En fait, CD16 est associé à des homodimères formés de sous-unités transmembranaires de transduction, ζ ou γ, qui possèdent un motif nommé ITAM dans leur queue cytoplasmique. Suite à l'engagement de CD16, on assiste à la phosphorylation des résidus tyrosine de ce motif, ce qui permet le recrutement et l'activation de PTK possédant des domaines SH2, telles que ZAP-70 et Syk. Les PTK ainsi activées, phosphorylent les résidus tyrosine appartenant à différents substrats, ce qui permet le recrutement d'effecteurs secondaires et qui mèneront finalement, à l'activation de la cellule. D'autre part, l'engagement d'un récepteur Ly49 inhibiteur provoque la phosphorylation de l'ITIM de sa queue cytoplasmique. Ceci induit le recrutement et l'activation de PTP telles SHP-1 et SHP-2. La co-agrégation d'un récepteur inhibiteur associé à une activité phosphatase et d'un récepteur activateur associé à une activité kinase, conduit à l'inhibition de la cascade d'activation par déphosphorylation. ITAM, "Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif"; ITIM, "Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif"; PTK, Protéine Tyrosine Kinase; PTP, Protéine Tyrosine Phosphatase; SH2, "Src Homology 2 domain"; SHP-1, "SH2-containing phosphatase".

Même si le détail de ces voies signalétiques demeure inconnu, il est important de mentionner que les cascades de signalisation enclenchées par les différents récepteurs NK sont différemment constituées et régulées. À titre d'exemple, la lyse dépendante des anticorps (ADCC) et la lyse naturelle de cellules cibles sont deux formes de cytotoxicité initiées par des récepteurs différents (respectivement, CD16⁺ (FcγRIIIA) et NKR-P1, par exemple) et qui ne partagent que seulement certains des éléments de leur cascade de signalisation. En effet, contrairement à l'ADCC, la cytotoxicité naturelle peut se faire via une voie dépendante de la protéine kinase C et indépendante de la phosphatidylinositol 3-kinase (Bonnema *et al.*, 1994). D'autre part, il a été démontré que l'engagement d'un des NKR activateur humain induit la synthèse de cytokines et non l'activité cytotoxique des cellules NK (Rajagopalan *et al.*, 2001).

LES RÉCEPTEURS DE LA FAMILLE LY49

L'appellation Ly49 ("Lymphocyte cell-surface antigen 49") a été utilisée pour la première fois en 1990 par l'équipe de Yokoyama et réfère à une molécule (antigène YE1/48) dont l'expression avait initialement été observée à la surface de lignées de cellules T tumorales (Chan et Takei, 1986), mais qui s'avérera être aussi exprimée à la surface d'une sous-population de cellules NK (Yokoyama *et al.*, 1990). Tel que mentionné précédemment, les récepteurs Ly49 appartiennent à la superfamille des lectines dimériques de type C (revu par Blery *et al.*, 2000). Ils sont constitués d'une portion extracellulaire comprenant un CRD et une tige, d'une portion transmembranaire ainsi que d'une portion cytoplasmique (Figure 2). Cette famille se compose de deux types de récepteurs. À partir des séquences des 23 gènes identifiés à ce jour, il semble que 13 d'entre eux possèdent des caractéristiques propres à des récepteurs d'inhibition (Ly49A, B, C, E, F, G, I, J, O, Q, S, T, V) et 10 à des récepteurs d'activation (Ly49D, H, K, L, M, N, P, R, U, W) (revu par Anderson *et al.*, 2001). Toutefois, certains d'entre eux pourraient ne pas coder de molécules fonctionnelles puisque l'on n'a pas encore détecté les ARNm (ARN messagers) correspondants (McQueen *et al.*, 1999).

Développement du répertoire de récepteurs Ly49 des cellules NK

Dans les années 90, plusieurs travaux appuyaient l'hypothèse de la reconnaissance de "l'absence du soi" par l'identification de récepteurs capables d'inhiber l'activité NK suite à la reconnaissance de molécules du CMH-I de l'hôte (revu par Trinchieri, 1994). On a alors supposé que si les cellules NK sont capables d'un tel discernement entre le soi et le non-soi, elles doivent posséder un répertoire de récepteurs qui a su s'adapter aux molécules du CMH-I de l'hôte. La multiplicité des membres de la famille Ly49 n'est pas le seul argument qui nous indique qu'ils jouent un rôle déterminant dans le répertoire de ces cellules. La diversité structurale de ces molécules, le polymorphisme de leurs gènes, la variation de leur niveau d'expression, l'existence de sous-populations chevauchantes de différentes tailles, la co-expression de plus d'un type de récepteur Ly49 de spécificité non-exclusive et "dégénérée" sur une même cellule, l'exclusion allélique, l'épissage alternatif de leur ARN, la délétion et la recombinaison de certains exons de différents gènes (Makrigiannis et Anderson, 2000; Makrigiannis et Anderson, 2001), seraient autant d'éléments contribuant à la définition du répertoire des cellules NK (revu par Anderson *et al.*, 2001). La technique de RT-PCR a permis d'analyser à l'échelle unicellulaire, le répertoire des récepteurs Ly49 exprimés à la surface de cellules NK de la souris B6 (Kubota *et al.*, 1999b; Takei *et al.*, 2001). Parmi les 80 cellules analysées, 66 patrons de co-expression distincts ont été observés.

Le(s) mécanisme(s) par lequel(lesquels) les cellules NK atteignent leur maturité fonctionnelle est(sont) encore inconnu(s). La définition du répertoire des cellules NK serait la conséquence de leur adaptation au répertoire des molécules du soi lors de leur développement dans la moelle osseuse (Roth *et al.*, 2000). Les molécules du CMH-I semblent être déterminantes dans la définition du nombre de cellules exprimant un récepteur donné et dans le nombre de récepteurs qu'une même cellule peut posséder (Manilay *et al.*, 1998; Korten *et al.*, 1999). On observe chez les souris CMH-I^{-/-} une augmentation substantielle de ces deux éléments comparativement aux souris de souches sauvages (Held *et al.*, 1996b; Dorfman *et al.*, 1997; Salcedo *et al.*, 1997). Aussi, par exemple, les cellules NK d'une souris d'haplotype H-2^b rejettent les cellules d'une souris

d'haplotype H-2^d, par contre les cellules NK d'une souris d'haplotype H-2^b transgénique pour le récepteur Ly49A inhibiteur ne rejette pas les cellules d'haplotype H-2^d, mais conserve la capacité de rejeter les cibles H-2^{b/-} et H-2^{d/-}. Donc, l'expression de Ly49A sur la totalité des cellules NK inhibe leur capacité à rejeter les cellules de provenance allogénique H-2^d. On présume que les cellules NK de la souris parentale H-2^b qui sont capables de rejeter des cellules d'haplotype H-2^d n'expriment pas le récepteur Ly49A ou tout autre récepteur d'inhibition spécifique de H-2^d et que conséquemment, le récepteur Ly49A est suffisant pour conférer une spécificité aux cellules NK qui l'expriment (Dorfman et Raulet, 1996). Ces résultats suggèrent que la restriction de l'expression de chacun des récepteurs Ly49 à une proportion définie (sous-population) des cellules NK est essentielle pour que celles-ci puissent demeurer capables d'attaquer les cellules allogéniques qu'elles rencontrent. D'ailleurs, la plupart des tumeurs présentent une chute sélective de l'expression d'une des molécules du CMH-I (Garrido *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 1999; Tortorella *et al.*, 2000). Sur une même cellule NK, la présence de plusieurs récepteurs d'inhibition de différentes spécificités réduirait sa capacité de pouvoir éliminer une cellule dont une seule molécule du CMH-I est atteinte. Les mécanismes qui minimiseraient la co-expression de plusieurs récepteurs Ly49 d'inhibition maximiseraient la fonctionnalité NK. Le modèle de "sélection" suppose que les cellules NK exprimant trop de récepteurs spécifiques du soi seraient tout simplement éliminées ou rendues anergiques (revu par Hoglund *et al.*, 1997). Le modèle "d'expression séquentielle" (Raulet *et al.*, 1997) fut suggéré suite à l'observation que les cellules NK acquièrent l'expression des récepteurs Ly49 de façon séquentielle et cumulative à partir de la naissance de l'animal. En effet, la fréquence de cellules NK exprimant plus de deux récepteurs Ly49 est supérieure chez des souris CMH-I^{-/-} comparativement aux souris de souches parentales (Held *et al.*, 1996b; Raulet *et al.*, 1997; Salcedo *et al.*, 1997). On pense que ce processus serait régulé par les interactions CMH-I/Ly49 : tant que la cellule n'exprime pas de récepteur spécifique du soi, elle serait soumise à des rondes consécutives d'initiation d'expression de nouveaux récepteurs.

Le processus de sélection du répertoire des cellules NK aurait deux conséquences majeures : il éduquerait les cellules NK à reconnaître et à éliminer les cellules qui présentent le phénotype de "l'absence du soi" et il permettrait d'induire la tolérance au soi chez les cellules NK potentiellement autoréactives qui expriment des récepteurs d'activation reconnaissant des molécules à la surface des cellules de l'hôte (Ohlen *et al.*, 1989). Voici que quelques exemples démontrant la capacité des cellules NK à s'adapter aux différentes molécules du CMH-I qui composent leur environnement : les cellules NK provenant d'une souris B6 (H-2^b) ne lysent pas des cellules cibles de provenance B6 (elles reconnaissent le soi), mais lysent celles provenant d'une souris congénique B6.D2 (H-2^d) (elles reconnaissent H-2^b comme "l'absence du soi"). Par contre, les cellules NK provenant d'une souris B6.D2 ne lysent pas les cellules cibles de nature B6.D2 (elles reconnaissent le soi), mais lysent celles de nature B6 (elles reconnaissent H-2D^d comme "l'absence du soi"). Aussi, les cellules NK provenant des souris B6 et B6.D2 lysent les cellules cibles provenant de souris $\beta_2m^{-/-}$ (elles reconnaissent "l'absence du soi"). Par contre, les cellules NK d'une souris $\beta_2m^{-/-}$ ne lysent pas des cellules cibles autologues, $\beta_2m^{-/-}$ (elles reconnaissent le soi) (Ohlen *et al.*, 1989; Ioannidis *et al.*, 2001).

Modèle de la "calibration" des récepteurs

Il a été proposé que le niveau d'expression des récepteurs Ly49 d'inhibition à la surface des cellules NK soit "calibré" par rapport aux molécules du CMH-I de l'hôte. Ce mécanisme aurait comme but d'ajuster leur réactivité envers le soi afin de rendre les cellules NK les plus sensibles possible aux altérations mineures que peuvent subir les cellules dont elles ont à vérifier l'intégrité (Olsson *et al.*, 1995; Sentman *et al.*, 1995). Les observations à la base du modèle proposé sont les suivantes : i) le niveau d'expression des récepteurs Ly49 d'inhibition est régulé à la baisse *in vivo* chez les souris exprimant des ligands de ces récepteurs (Sykes *et al.*, 1993; Karlhofer *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 1995) et ii) les cellules NK Ly49^{faible} semblent physiologiquement plus efficaces que les cellules présentant un niveau d'expression élevé de récepteurs, puisqu'elles parviennent à discerner les cellules cibles CMH-I^{faible} (qui sont détruites) des cellules CMH-I^{élevé} (qui sont épargnées), alors que les deux types de cellules cibles ne sont pas lysés par les

cellules Ly49^{élevé} (Olsson *et al.*, 1995). Conséquemment, les cellules NK Ly49^{faible} et Ly49^{élevé} se distinguent fonctionnellement par leur capacité différentielle à pouvoir éliminer les cellules cibles présentant un faible niveau de molécules du CMH-I. L'équipe de Kärre propose qu'il puisse donc y avoir une corrélation entre le nombre d'interactions récepteur/ligand et l'amplitude des signaux générés à l'intérieur de la cellule et qu'un certain niveau seuil doive être atteint pour que cette amplitude soit assez élevée pour engendrer une conséquence fonctionnelle, telle l'inhibition de l'activité lytique NK (Sentman *et al.*, 1995). Les cellules NK Ly49^{faible} seraient incapables de recevoir un signal d'inhibition supérieur à ce niveau seuil de la part des cellules CMH-I^{faible}, ces dernières étant conséquemment éliminées. Au contraire, les cellules NK Ly49^{élevé} épargnent les cellules CMH-I^{faible} puisque le niveau seuil est atteint (Figure 4). En définitive, ce modèle propose que le phénotype Ly49^{faible}, fruit d'une "calibration" de la part de l'hôte, puisse permettre à la cellule NK de reconnaître les cellules de faible niveau d'expression du CMH-I avec une sensibilité accrue tout en préservant sa propriété d'auto-tolérance. Dans ces circonstances, les cellules NK Ly49^{élevé} seraient inutiles dans le contexte d'infections par des micro-organismes pathogènes ou de transformations néoplasiques, situations auxquelles ces cellules seraient incapables de réagir par leur état d'activation constamment tenu en échec.

Plusieurs études ont démontré que les molécules du CMH-I présentes à la fois à la surface des cellules environnantes (molécules du CMH-I dites externes) (Sykes *et al.*, 1993; Johansson *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 1998; Kase *et al.*, 1998) et à la surface même des cellules NK (molécules du CMH-I dites internes) (Andersson *et al.*, 1998; Kase *et al.*, 1998), modulent le niveau d'expression des récepteurs Ly49 à la surface des cellules NK, même matures (voir plus loin). De plus, cette modulation est en corrélation avec le niveau d'expression du ligand (Sykes *et al.*, 1993) et avec la proportion de cellules environnantes l'exprimant (Kase *et al.*, 1998; Manilay *et al.*, 1999). L'équipe de Sykes a procédé au transfert de différentes quantités de cellules de moelle osseuse provenant de souris exprimant le ligand de Ly49A, H-2D^d, chez des souris allogéniques H-2^b préalablement irradiées, créant ainsi des souris présentant différents niveaux de chimérisme.

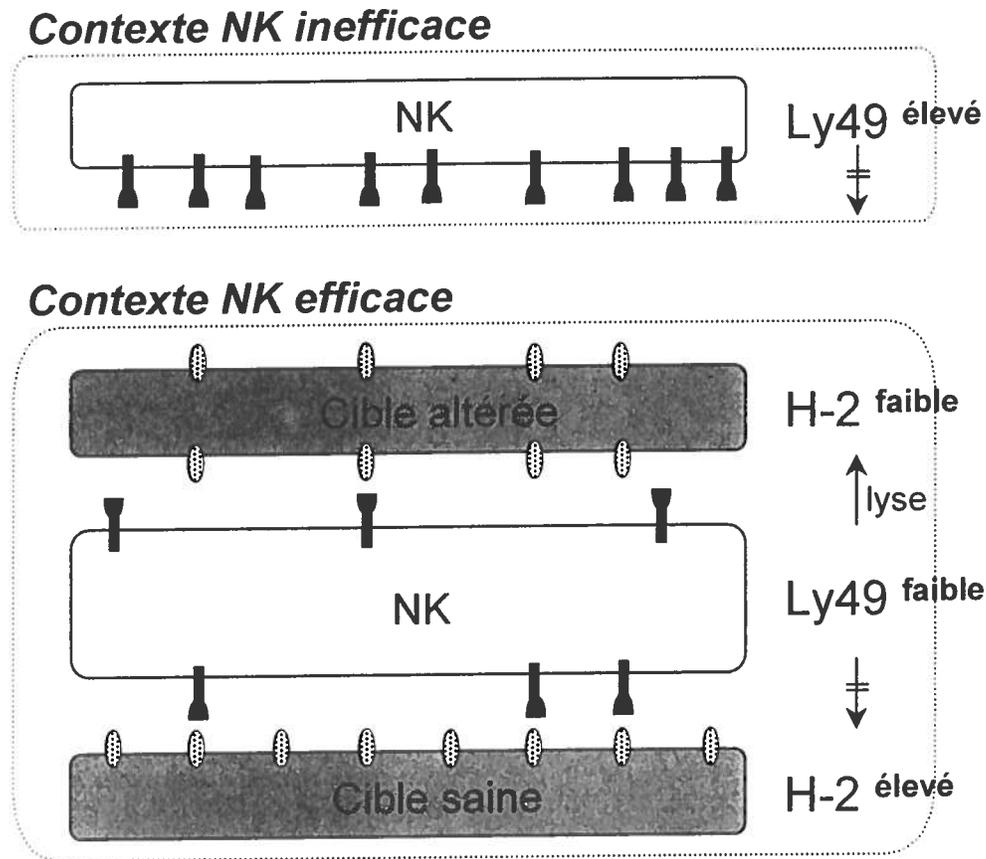


Figure 4 : Modèle de la “calibration” des récepteurs Ly49.

Portion du bas de la figure. Selon ce modèle, les cellules NK Ly49^{faible} provenant d'une souris exprimant le ligand du récepteur Ly49, peuvent distinguer les cellules cibles de bas (CMH-I^{faible}) et haut (CMH-I^{élevé}) niveau d'expression de molécules du CMH-I : seules les cellules CMH-I^{élevé} engendrent un signal d'inhibition suffisamment fort pour être protégées de la lyse NK; à l'opposé les cellules CMH-I^{faible} seront éliminées. **Portion du haut de la figure.** Les cellules NK Ly49^{élevé} provenant d'une souris chez qui le ligand du récepteur est absent, voient leurs récepteurs suffisamment engagés par les deux types de cellules cibles (CMH-I^{faible} et CMH-I^{élevé}) pour engendrer un signal d'inhibition fonctionnellement perceptible : aucune des deux cibles ne sera lysée. Tirée de Höglund et *al.*, 1997.

Les résultats démontrent que le niveau d'expression de Ly49A à la surface des cellules du donneur et du receveur, qui respectivement expriment ou n'expriment pas son ligand, est en corrélation inverse avec le niveau de chimérisme; soit la proportion de cellules du donneur ligand⁺ transférées chez le receveur ligand⁻. Étonnamment, le niveau d'expression de Ly49A à la surface des cellules du donneur (exprimant le ligand H-2D^d) est plus élevé à faible pourcentage de chimérisme qu'il ne l'est chez la souris parentale qui est la source même de ces cellules. Selon le modèle de la "calibration", puisque le ligand de ce récepteur est présent à la fois chez la souris chimérique et chez la souris parentale, les cellules NK de ces souris devraient exprimer le même niveau de Ly49A. Donc, le niveau d'expression des NKR serait **modulé** en corrélation inverse avec la fréquence de contact qu'ils ont avec leurs ligands ("receptor **modulation** theory"; Manilay *et al.*, 1999) plutôt que d'être uniquement **calibré** par rapport à un niveau optimal prédéterminé, mécanisme qui serait enclenché que par la simple présence (qualitative) de leurs ligands dans leur environnement ("receptor **calibration** theory"; Sentman *et al.*, 1995).

Fait intéressant, les molécules du CMH-I internes et externes ne semblent toutefois pas jouer le même rôle dans la régulation de niveau d'expression des récepteurs Ly49. Lorsque des cellules NK matures sont activées, par exemple en présence d'IL-2, celles de phénotype ligand⁻ voient leur niveau d'expression de Ly49 augmenter de façon importante, qu'elles soient ou non en présence de cellules ligand⁺, contrairement aux cellules NK ligand⁺ qui conservent un faible niveau de Ly49. Les molécules du CMH-I internes assureraient donc une stabilité du niveau d'expression de ces récepteurs pour qu'il demeure faible (Andersson *et al.*, 1998; Kase *et al.*, 1998). Suite au transfert adoptif de cellules spléniques provenant d'une souris B6 (H-2^b, chez qui il y a absence de ligand pour Ly49A) chez une souris irradiée BALB/c (H-2^d, chez qui le ligand H-2D^d de Ly49A est présent), Höglund et collaborateurs ont observé que le niveau d'expression de Ly49A chute rapidement à la surface des cellules NK matures d'origine B6 dans les premières heures suivant leur transfert, comparativement au niveau retrouvé chez la souris B6 parentale (Kase *et al.*, 1998). Ainsi, la modulation du niveau d'expression des récepteurs

Ly49 serait un paramètre reflétant la conséquence d'une adaptation rapide et constante à l'environnement dans lequel se retrouvent les cellules NK (Kase *et al.*, 1998). Les mécanismes moléculaires responsables de réguler la quantité de récepteurs Ly49 exprimés à la surface des cellules NK sont inconnus. Un des mécanismes proposés est celui de l'internalisation puisqu'elle est indépendante du développement des cellules NK et que c'est un mécanisme permettant une adaptation rapide (Held et Raullet, 1997; Kase *et al.*, 1998).

Ligands

Ayant été identifié le premier, Ly49A est en quelque sorte le récepteur inhibiteur prototype de la famille Ly49. La spécificité de ce récepteur a été beaucoup étudiée et ce, généralement par des analyses d'adhésion de cellules Ly49A⁺ en présence de molécules purifiées ou de formes tétramériques du CMH-I, ou encore, en présence de cellules CMH-I⁺ d'identité connue. Le traitement de cellules cibles à l'aide de différents AcMo spécifiques des différents domaines de la molécule H-2D^d, abroge l'interaction Ly49A/H-2D^d. Ceci a permis de déterminer que les portions $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la molécule H-2D^d sont requises pour la reconnaissance de Ly49A, contrairement à la portion $\alpha 3$ (Karlhofer *et al.*, 1992; Daniels *et al.*, 1994b; Kane, 1994). L'utilisation de molécules du CMH-I chimériques a permis de confirmer ces résultats (Sentman *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1998; Sundback *et al.*, 1998). La spécificité de plusieurs des membres de la famille Ly49 a été identifiée par des méthodes analogues. Il ne serait pas pertinent de discuter ici de la spécificité de chacun des récepteurs Ly49. Je ne vais qu'énumérer celle des récepteurs faisant l'objet de mes travaux qui ont tous été effectués chez des souris d'haplotypes H-2^d et H-2^b (Tableau 1/Annexe A). Pour les molécules de ces haplotypes, Ly49A reconnaît H-2D^d (Tableau 2/Annexe B), Ly49C reconnaît H-2D^d, H-2K^d, H-2K^b (Tableau 2/Annexe B), Ly49G2 reconnaît H-2D^d et Ly49I reconnaît H-2D^d ainsi que H-2K^b (Hanke *et al.*, 1999; Michaelsson *et al.*, 2000; Silver *et al.*, 2000; Silver *et al.*, 2001). Toutefois, il est important de noter que pour la majorité de ces études, les techniques utilisées ne correspondent pas à des analyses fonctionnelles. L'importance de cet aspect est d'ailleurs le sujet du deuxième article de cette thèse. La spécificité des

récepteurs Ly49 identifiée jusqu'à présent ne semble pas fournir un répertoire de reconnaissance permettant d'éviter totalement l'auto-immunité. Par exemple, seuls Ly49C et Ly49I qui sont exprimés sur environ 30% des cellules NK semblent reconnaître une molécule du CMH-I de la souris B6 (H-2^b) (Hanke *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). Toutefois, il est important de noter que la spécificité de plusieurs molécules Ly49 n'a pas encore été identifiée et que les membres de cette famille ne semblent pas encore être tous identifiés (Depatie *et al.*, 2000; Makrigiannis et Anderson, 2000).

La capacité des récepteurs Ly49 à pouvoir reconnaître de façon sélective le peptide niché dans les molécules du CMH-I est un sujet très controversé. En voici quelques exemples. Ly49A semble reconnaître H-2D^d seulement lorsqu'il est couplé à un peptide, sans toutefois être en mesure de distinguer la nature de ce dernier (Correa et Raulet, 1995; Orihuela *et al.*, 1996; Tormo *et al.*, 1999). Par contre, les interactions Ly49C/H-2K^b et Ly49I/H-2K^d semblent être à la fois dépendantes de la présence du peptide et sélectives de sa séquence (Franksson *et al.*, 1999; Hanke *et al.*, 1999; Michaelsson *et al.*, 2000). Ceci pourrait conférer aux cellules NK la capacité de reconnaître des cellules infectées chez qui les peptides présentés sont de nature virale. D'autre part, il est important de noter qu'il existe une corrélation entre le niveau de protection induite contre l'activité cytotoxique NK et le niveau de stabilité qu'assure la présence d'un peptide dans une molécule du CMH-I (Correa et Raulet, 1995).

Plusieurs études suggèrent aussi l'importance de l'implication de la β_2m pour l'interaction Ly49/CMH-I. L'équipe de Margulies a démontré que la molécule β_2m semble jouer un rôle dans la reconnaissance de H-2D^d par le récepteur Ly49A (Wang *et al.*, 2002), puisque l'utilisation d'un AcMo dirigé contre la molécule β_2m , abroge complètement cette reconnaissance. Aussi, l'utilisation d'une β_2m de nature humaine plutôt que murine, dans la formation de formes tétramériques des molécules du CMH-I, cause l'absence d'interaction entre Ly49A et D^d ainsi qu'entre Ly49C et K^b (Michaelsson *et al.*, 2001).

La capacité des récepteurs Ly49 à pouvoir reconnaître les sucres des molécules du CMH-I est aussi un sujet controversé. Les récepteurs appartenant à la superfamille des lectines de type C, par extrapolation à partir de la structure tridimensionnelle de Ly49, semblent démontrer un très faible niveau d'homologie avec d'autres membres de cette famille qui ont les sucres comme ligands et ce, dans les régions critiques de liaison récepteur/ligand. Et même si le CRD des récepteurs Ly49 possède certains motifs très similaires à ceux retrouvés dans les lectines de type C, les séquences en sont divergentes (Drickamer et Taylor, 1993). Ceci se reflète d'ailleurs par la diversité structurale des ligands que ces récepteurs reconnaissent (revu par Hofer *et al.*, 2001). Par exemple, les molécules du CMH-I exprimées dans des systèmes bactériens peuvent être utilisées avec efficacité dans les tests d'adhésion aux récepteurs Ly49, de même que pour la préparation des formes tétramériques des molécules du CMH-I (Hanke *et al.*, 1999; Michaelsson *et al.*, 2000). Toutefois, il a été démontré que le glucose peut interférer partiellement avec l'inhibition de l'activité cytotoxique NK par Ly49A (Daniels *et al.*, 1994b; Brennan *et al.*, 1995). Le traitement de cellules cibles à la tunicamycine, un inhibiteur de la glycosylation, atténue l'interaction Ly49A/H-2D^d (Chang et Kane, 1998) et cause les mêmes effets que le glucose (Daniels *et al.*, 1994b). De plus, l'équipe de Takei a démontré qu'un des deux sites conservés de glycosylation de la molécule H-2D^d est nécessaire pour que les récepteurs Ly49A et Ly49C puissent la reconnaître (Lian *et al.*, 1998). À la lumière de ces résultats, il demeure possible que la glycosylation des molécules du CMH-I puisse influencer l'avidité de l'interaction Ly49/CMH-I. Aussi, il ne faut pas perdre de vue que l'interaction des récepteurs Ly49 avec les cellules cibles pourrait impliquer la reconnaissance de sites de glycosylation retrouvés sur d'autres molécules que celles du CMH-I.

L'équipe de Mariuzza fut la première à cristalliser le complexe Ly49A/H-2D^d dans lequel deux sites de liaison ont été identifiés (Tormo *et al.*, 1999). Le premier site implique la liaison entre Ly49A et un côté exposé du domaine $\alpha 2$ de la molécule du CMH-I qui forme la niche peptidique. Ce site exclut tout contact avec le peptide lui-même, donc seuls les changements conformationnels des régions reconnues par le récepteur et conséquents des

variations de la nature du peptide qui s'y trouve peuvent expliquer la nécessité de la présence du peptide pour que l'interaction récepteur/ligand ait lieu. Ce site est constitué de nombreux résidus polymorphiques parmi les allèles des molécules du CMH-I qui pourraient expliquer la spécificité de Ly49A. En effet, les résidus de ce site sont conservés chez H-2D^k, qui est aussi un ligand de Ly49A, mais pas dans les molécules H-2D^b, H-2K^b et H-2K^d qui ne semblent pas être des ligands fonctionnels du récepteur. Par contre, des analyses de mutagenèse dirigée ont récemment démontré que ces résidus ne sont pas responsables de la spécificité de Ly49A envers H-2D^d (Matsumoto *et al.*, 2001b).

Le site 2 est en quelque sorte une concavité formée des domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et de la β_2m de la molécule du CMH-I (Tormo *et al.*, 1999). Puisque aucun résidu polymorphique ne s'y trouve, seuls des changements conformationnels consécutifs de variations alléliques à des positions distantes de ce site pourraient expliquer la spécificité des récepteurs Ly49. Puisque l'interruption de l'interaction entre le site 2 de la molécule H-2D^d et le récepteur Ly49A enclenche la cytotoxicité NK, ce dernier constituerait le site de liaison fonctionnel de ce récepteur (Nakamura *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001a). De même, des études rapportent que ce sont les mutations dans le site 2 qui semblent affecter davantage l'interaction Ly49A/H-2D^d (Chung *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001b). Or, ces résultats n'expliquent pas la spécificité allélique que peut avoir Ly49A puisque les résidus du site 2 responsables du contact avec la molécule H-2D^d ne sont pas polymorphiques entre les différents allèles des molécules du CMH-I. D'ailleurs, Kärre et collaborateurs viennent tout juste de publier une étude démontrant que les régions de Ly49C impliquées dans l'interaction avec ses ligands sont les mêmes que celles identifiées pour Ly49A (Sundback *et al.*, 2002). Toutefois, l'équipe de Margulies vient de publier une étude qui suggère l'implication de molécules d'eau dans le site 2. Les résidus de la molécule H-2 impliqués dans les interaction avec ces molécules d'eau pourraient offrir une base moléculaire à la spécificité allélique des NKR (Wang *et al.*, 2002).

Finalement, il est important de noter que les sites 1 et 2 sont distincts de celui du TCR, ce qui suggère la possibilité qu'une interaction simultanée de la molécule du CMH-I avec ces deux types de récepteurs puisse avoir lieu (Chung *et al.*, 1999; Natarajan *et al.*, 1999).

Reconnaissance “non-exclusive” et “dégénérée”

Plusieurs récepteurs Ly49 reconnaissent des molécules du CMH de classe I comme ligands et ce de façon “non-exclusive”, c'est-à-dire que leur(s) spécificité(s) sont partagées par différents récepteurs. La plupart des récepteurs Ly49 inhibiteurs (Ly49A, Ly49C et Ly49G2) et activateurs (Ly49D, Ly49P et Ly49W) dont les ligands ont été identifiés, se lient à H-2D^d (George *et al.*, 1999a; Nakamura *et al.*, 1999; Silver *et al.*, 2000; Silver *et al.*, 2001). Toutefois, des études de mutagenèse dirigée ont démontré que le récepteur Ly49A inhibiteur et le récepteur Ly49D activateur possèdent des exigences distinctes pour leur interaction avec cette molécule (Nakamura *et al.*, 2000). En effet, l'interaction Ly49D/H-2D^d est beaucoup plus sensible aux mutations des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de H-2D^d que l'interaction Ly49A/H-2D^d. Cette observation pourrait être expliquée par deux hypothèses qui ne s'excluent pas nécessairement. La première hypothèse suggère que les sites de contact récepteur/ligand soient distincts. La deuxième suggère que l'avidité de ces deux récepteurs pour ce ligand puisse ne pas être de même puissance. La deuxième hypothèse cadre bien avec les différentes observations suggérant que les récepteurs d'inhibition et d'activation NK diffèrent dans leur affinité de liaison. En effet, de façon générale les récepteurs d'inhibition possèdent une affinité plus grande pour leurs ligands que leurs contreparties activatrices (Biassoni *et al.*, 1997; Vales-Gomez *et al.*, 1998a; Vales-Gomez *et al.*, 1998b; Winter *et al.*, 1998; Vales-Gomez *et al.*, 1999; Moretta *et al.*, 2000; Nakamura et Seaman, 2001). Les différences observées dans la reconnaissance des molécules du CMH-I entre les récepteurs d'activation et d'inhibition, peuvent être importantes dans la régulation des réponses NK. Par exemple, la majorité des cellules Ly49D⁺ dont le ligand est H-2D^d, co-expriment un récepteur d'inhibition spécifique de la même molécule (Kubota *et al.*, 1999b; Takei *et al.*, 2001). Puisque les cellules NK peuvent exprimer simultanément des récepteurs d'activation et d'inhibition spécifiques de molécules du CMH-I du soi, la plus forte affinité des récepteurs

d'inhibition pour leurs ligands pourrait prévenir l'auto-immunité envers les cellules exprimant des niveaux normaux de molécules du CMH-I.

Certains des récepteurs Ly49 possèdent une reconnaissance dite "dégénérée" puisque chacun d'eux peut reconnaître plusieurs molécules ou allèles du CMH-I (revu par Anderson *et al.*, 2001). De façon surprenante, le récepteur Ly49C semble reconnaître toutes les molécules du CMH-I testées jusqu'à maintenant, à l'exception de H-2L^d. Est-ce que ce récepteur pourrait permettre aux cellules NK de vérifier l'intégrité globale des molécules du CMH-I des cellules de l'hôte? Le même type de rôle pourrait être attribué à Ly49V, un récepteur inhibiteur de la souris 129/J qui reconnaît aussi une panoplie de molécules du CMH-I (Makrigiannis *et al.*, 2001).

Rôles des récepteurs Ly49 exprimés à la surface des cellules NK

L'équipe de Yokoyama a été la première à identifier la propriété inhibitrice du récepteur Ly49A suite à son engagement avec des molécules du CMH-I (Karlhofer *et al.*, 1992). En effet, les cellules cibles exprimant les molécules d'haplotype H-2^d ou H-2^k étaient préférentiellement réfractaires à l'attaque des cellules NK Ly49A⁺. Aujourd'hui, l'identification des ligands de plusieurs récepteurs Ly49 a permis l'analyse de leurs fonctions. Notamment, les récepteurs Ly49A, Ly49C et Ly49G2 sont capables d'abroger la production de cytokines et l'activité cytotoxique des cellules NK lorsqu'ils reconnaissent leurs ligands à la surface de cellules cibles (Daniels *et al.*, 1994a; Mason *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 1997; Kim et Yokoyama, 1998; Raziuddin *et al.*, 1998; Ortaldo *et al.*, 1999a). Il a été démontré que l'engagement du récepteur Ly49A inhibe l'activation (exocytose granulaire et production de cytokines) résultant de la stimulation via NK1.1 (Kim et Yokoyama, 1998) et via Ly49D (George *et al.*, 1999b). Il en est de même pour le récepteur Ly49G2 inhibiteur face au récepteur Ly49D activateur (George *et al.*, 1999b). Cependant, un récepteur d'inhibition n'a pas besoin d'appartenir à la même famille que le récepteur d'activation avec lequel il est co-agrégé pour parvenir à inhiber son action. Par exemple, les récepteurs KIR et CD94/NKG2 inhibiteurs abrogent l'activation initiée via le récepteur CD16 activateur

(Binstadt *et al.*, 1996; Le Drian *et al.*, 1998) qui appartient à la famille MIRR (“Multichain Immune Recognition Receptor”) et dont font d’ailleurs partie le TCR et le BCR qui peuvent aussi être inhibés par ce type de récepteur inhibiteur (Poggi *et al.*, 1997; Motoda *et al.*, 2000).

L’équipe d’Ortaldo a été la première à rapporter une fonction activatrice pour un des membres de la famille Ly49 (Mason *et al.*, 1996). Elle a observé que la présence d’AcMo anti-Ly49D augmentait la lyse de cellules FcγR⁺ par les cellules NK. Ultérieurement, il a été rapporté que l’engagement des récepteurs Ly49D et Ly49H peut initier différentes cascades signalétiques menant à la synthèse de cytokines et à l’enclenchement de l’activité cytotoxique des cellules NK qui les expriment (Lanier, 1998; Mason *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Gosselin *et al.*, 1999; Mason *et al.*, 2000; Ortaldo *et al.*, 2001).

Les récepteurs d’inhibition et d’activation diffèrent en plusieurs points : leur patron d’expression à la surface des cellules NK, leur façon de reconnaître leurs ligands ainsi que leur façon de transmettre leurs signaux à l’intérieur de la cellule (revu par Anderson *et al.*, 2001 ainsi que par Raulet *et al.*, 2001). Peut être que ces différences ont une incidence sur leurs implications différentielles dans les différentes fonctions des cellules NK? Le rôle des récepteurs Ly49 inhibiteurs serait de reconnaître “l’absence du soi”. Toutefois, le rôle biologique de récepteurs d’activation spécifiques des molécules du CMH-I à la surface des cellules NK est une énigme. La co-expression d’un récepteur d’activation spécifique des mêmes molécules du CMH-I qu’un récepteur d’inhibition, pourrait permettre le recrutement de PTK nécessaires pour phosphoryler l’ITIM de ce récepteur d’inhibition (qui ne possède pas d’activité tyrosine kinase intrinsèque). Alternativement, si les deux récepteurs co-exprimés n’ont pas les mêmes molécules du CMH-I comme ligands, la perte préférentielle du ligand du récepteur d’inhibition à la surface de cellules cibles permettrait une activation cellulaire (Lanier, 1998). Si les récepteurs d’activation reconnaissent des ligands qui ne sont pas des molécules du CMH-I, ne pourraient-ils pas correspondre à des ligands exprimés par certains micro-organismes ou dont l’expression est induite dans certaines conditions pathologiques? L’existence de ligands dont

l'expression peut être induite, suggère un rôle important pour les récepteurs d'activation respectifs dans la surveillance immunitaire des cellules NK contre les tumeurs et les infections par des micro-organismes pathogènes. De plus, la nature diverse des récepteurs d'activation des cellules NK suggère que ces cellules soient capables de reconnaître un large éventail de tumeurs et de pathogènes (Nakamura et Seaman, 2001; Smith *et al.*, 2001). Aussi, un rôle pourrait être envisagé pour les récepteurs d'activation lors du développement des cellules NK. En effet, l'initiation de cascades d'activation suite à la reconnaissance des molécules du CMH-I pourrait être nécessaire à la sélection positive des cellules NK (Lanier, 1998). Finalement, l'existence de ligands allogéniques pourrait avoir un rôle à jouer dans le rejet de cellules étrangères comme par exemple dans le cas de greffes. Notons que pour les souches murines examinées jusqu'à maintenant, les récepteurs Ly49 activateurs exprimés sont majoritairement de spécificités allogéniques (George *et al.*, 1999b; Nakamura *et al.*, 1999; Silver *et al.*, 2000; Silver *et al.*, 2001).

LES CELLULES NK ET LA RÉSISTANCE ANTIVIRALE

Tel que mentionné précédemment, l'importance de la participation des cellules NK dans l'immunité anti-infectieuse a été démontrée et ce, pour plusieurs types d'infections par des micro-organismes pathogènes. Puisque l'infection par le cytomégalovirus fait l'objet du premier volet de mon projet de recherche, elle sera présentée de façon plus détaillée.

CMV

Le cytomégalovirus est un micro-organisme pathogène important puisque plus de 80% de la population est séropositive. Il cause une infection latente dont les épisodes de réactivation sont habituellement asymptomatiques chez les individus immunocompétents (revu par Reddehase, 2000). Cette symbiose hôte/virus nécessite qu'il y ait un équilibre entre la réplication du virus et la réponse immunitaire de l'hôte. Toutefois, toute situation anormale peut perturber cet équilibre et déclencher une propagation virale non contrôlée

dont les conséquences physiopathologiques sont importantes. L'état d'immunodéficience que l'on retrouve chez les personnes greffées et chez les personnes séropositives pour le VIH en est un bon exemple. Le nombre croissant de personnes qui en sont atteintes suscite d'ailleurs une préoccupation croissante dans le monde médical. Chez les personnes immunocompétentes, le CMV entraîne rarement des dommages hépatiques (Snover et Horwitz, 1984; Cohen et Corey, 1985). Chez les personnes immunodéficientes par contre, le CMV cause des hépatites fulminantes ou chroniques qui peuvent mener à des cirrhoses et même, entraîner la mort de l'individu (revu par Smith et Brennessel, 1994). Ceci illustre bien le rôle actif du système immunitaire pour contrôler l'infection virale afin que les épisodes de réactivation ne causent ni de morbidité et ni de mortalité par complications pathologiques (Rook, 1988; Wattle *et al.*, 1995).

Stratégies d'échappement du CMV au système immunitaire

Le CMV appartient à la famille des virus herpétiques dont les membres, lors de leur évolution, ont développé plusieurs stratégies leur permettant d'échapper à la surveillance immunitaire et aussi d'être transmis sans le moindre symptôme apparent (revu par Farrell et Davis-Poynter, 1998). Afin de coexister de façon permanente chez ses hôtes, le CMV établit un état de latence et restreint au maximum le nombre de gènes viraux exprimés dans le but de diminuer son exposition au système immunitaire. De plus, il utilise pour sa réplication des tissus dans lesquels la surveillance immune est moins rigoureuse. Son bourgeonnement dans des fluides corporels lui permet d'être facilement transmissible entre les individus. Finalement, il arrive à compromettre les défenses antivirales de son hôte en exprimant différents facteurs dont la fonction est d'amortir la réponse immune de l'hôte. Voici quelque exemples de stratégies qu'adopte ce virus pour arriver à ses fins : inhibition de l'expression des molécules du CMH-I, synthèse d'homologues de chimiokines, de cytokines, de récepteurs de chimiokines, de récepteurs d'anticorps et d'homologues des molécules du CMH-I (revu par Hengel *et al.*, 1998). À titre d'exemple, la protéine codée par le gène US3 retient les molécules du CMH-I dans le réticulum endoplasmique, celles codées par US2 et US11 les redirigent vers le cytoplasme où elles sont dégradées et interfère ainsi avec leur progression vers l'appareil de Golgi et US6

interfère avec le processus de chargement peptidique de ces molécules (revu par Hengel *et al.*, 1999). Ceci empêchera les molécules du CMH-I d'être exprimées convenablement en surface cellulaire et rendra la cellule infectée hors de portée des lymphocytes T cytotoxiques. Par contre, la chute des molécules du CMH-I rendra la cellule infectée susceptible à l'attaque par des cellules NK qui elles patrouillent pour "l'absence du soi" (tel que décrit précédemment). En guise d'explication, on avait alors émis l'hypothèse que des homologues viraux des molécules du CMH-I, puissent interférer avec l'activation des cellules NK lors de l'infection par le CMV (Fahnestock *et al.*, 1995). Deux modèles ont été proposés : le modèle de "l'échappement aux cellules NK" et le modèle de "l'inhibition indirecte des cellules NK" (revu par Davis-Poynter *et al.*, 1999). Le premier modèle suggère que les cellules infectées présentant un faible niveau d'expression des molécules du CMH-I et qui sont normalement susceptibles aux cellules NK, deviendraient résistantes à l'attaque de ces dernières par l'expression d'un homologue de classe I viral qui lui, engagerait un récepteur d'inhibition à la surface des cellules NK (Fahnestock *et al.*, 1995). Le modèle de "l'inhibition indirecte des cellules NK" suggère que les cellules auxiliaires requises pour le recrutement et l'activation des cellules NK seraient réprimées dans leurs actions (synthèse de chimiokines et de cytokines), par l'interaction de leurs récepteurs d'inhibition avec les homologues viraux du CMH-I exprimés à la surface des cellules infectées de leur environnement. Par exemple, les cellules dendritiques qui peuvent stimuler les cellules NK par la production d'IL-12 (Fernandez *et al.*, 1999), pourraient être inhibées par l'interaction entre leur récepteur LIR-1 et la molécule UL18 (Borges *et al.*, 1997). En effet, le CMV code pour un homologue de molécules du CMH-I nommé UL18 (Beck et Barrell, 1988) dont l'expression n'est pas affectée par les protéines US2, US3, US6 et US11 (Park *et al.*, 2002). Or, UL18 lie LIR-1 qui est un récepteur d'inhibition (Cosman *et al.*, 1997; Fanger *et al.*, 1998). Cependant, même si l'hypothèse est attrayante, on ne possède toujours pas de preuve que UL18 puisse offrir une protection aux cellules infectées par le biais d'une interaction avec la molécule LIR-1 exprimée à la surface des cellules cytotoxiques NK ou d'autres types cellulaires pouvant participer à la réponse immune de l'hôte contre cette infection.

Le CMV code aussi pour deux autres types de leurres bien distincts : *UL16* et *UL40*. La protéine UL16 reconnaît les mêmes ligands que NKG2D, soit ULBP et MIC dont l'expression est induite à la surface des cellules infectées par le CMV (Cosman *et al.*, 2001; Kubin *et al.*, 2001). Puisqu'il a été observé que l'interaction MIC/NKG2D augmente l'activité des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques et que la présence de molécule soluble UL16 inhibe l'initiation de cette interaction (Groh *et al.*, 2001; Kubin *et al.*, 2001; Sutherland *et al.*, 2002), il a été proposé que UL16 permettrait au CMV d'échapper à la surveillance du système immunitaire. On pense que UL16 pourrait masquer la présence des ligands de NKG2D à la surface des cellules infectées ou encore, pourrait séquestrer ces ligands à l'intérieur de vésicules intracellulaires, ce qui empêcherait leur acheminement à la surface membranaire (Sutherland *et al.*, 2001). D'autre part, le CMV code le gène *UL40* qui est identique à la séquence du peptide signal de HLA-Cw03 (Tomasec *et al.*, 2000; Ulbrecht *et al.*, 2000). Ce dernier, lorsqu'il est associé à HLA-E, est reconnu par le récepteur CD94/NKG2A inhibiteur (Braud *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998). L'expression de *UL40* chez des cellules présentant un haut niveau d'expression de la molécule HLA-E, leur confère une résistance contre l'attaque de cellules NK exprimant le récepteur CD94/NKG2A (Tomasec *et al.*, 2000; Ulbrecht *et al.*, 2000; Cerboni *et al.*, 2001). Donc, l'expression des gènes *UL16* et *UL40* à la surface de cellules infectées permettrait au virus de tromper la surveillance effectuée par les cellules NK exprimant les récepteurs NKG2D et CD94/NKG2A, respectivement.

En résumé le CMV peut stimuler ou inhiber le système immunitaire à son avantage. Ainsi il peut induire l'augmentation de son taux répliatif, le recrutement de cellules non-infectées au site d'infection, l'inhibition de l'activation de cellules immunes ou l'altération du trafic de cellules immunes. L'ensemble de ces mécanismes permet à ce virus de n'être ni détecté ni substantiellement éliminé tout au long de son cycle infectieux. La démonstration que UL18 puisse inhiber l'activité lytique des cellules NK a été la première démonstration que les virus ont développé des stratégies pour échapper à la surveillance de ces cellules. Si le CMV qui a coévolué chez les mammifères depuis des millions d'années (McGeoch *et al.*, 1995) a développé de telles stratégies, c'est que le

besoin d'éviter l'activité NK doit représenter une pression sélective assez puissante pour influencer l'évolution de certains pathogènes.

MCMV

L'infection par le MCMV chez la souris constitue l'un des modèles expérimentaux du CMV les plus utilisés (Scalzo *et al.*, 1990). En effet, les caractéristiques des pathologies que ce virus engendre chez la souris sont très similaires à celles observées chez l'humain (Olver *et al.*, 1994). Mis à part l'hépatite, les manifestations pathologiques les plus importantes de cette infection sont la rétinite, la pneumonie et les problèmes gastro-intestinaux. L'éventail de ces manifestations s'explique par la multitude et la localisation ubiquitaire des types cellulaires pouvant être infectés par ce virus. En effet, le MCMV peut infecter les cellules endothéliales et épithéliales, les fibroblastes et surtout les monocytes/macrophages qui constituent le site de latence de prédilection de ce virus (revu par Sinclair et Sissons, 1996 ainsi que par Sinzger et Jahn, 1996). Le MCMV partage aussi avec son homologue humain, plusieurs stratégies d'échappement. À titre d'exemple, le MCMV code un homologue des molécules du CMH-I nommé m144 (Rawlinson *et al.*, 1996). L'ensemble des travaux concernant m144, suggère qu'il contribuerait à l'échappement viral en interférant avec l'élimination des cellules infectées par les cellules NK (Farrell *et al.*, 1997; Cretney *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 1999a). Toutefois, on ne sait toujours pas s'il existe un récepteur murin qui puisse reconnaître la molécule m144 de façon spécifique et fonctionnelle.

Cmv1

Le gène *Cmv1* détermine la réponse précoce à l'infection par le MCMV dans la rate, la moelle osseuse et le thymus, mais pas dans le foie (Scalzo *et al.*, 1990; Price *et al.*, 1993). Il y a deux formes alléliques au *Cmv1* : un allèle de résistance dominant nommé *Cmv1^r* qui est présent chez les souris de fond génétique C57BL ainsi que chez la souris Ma/MyJ (Bancroft *et al.*, 1981; Shellam *et al.*, 1981; Bukowski *et al.*, 1984) et un allèle de susceptibilité récessif nommé *Cmv1^s* qui est présent chez les souches murines BALB/c, A/J et DBA/2 (Scalzo *et al.*, 1992). Les souris de phénotype *Cmv1^r* montrent des titres

viraux spléniques de 10^3 à 10^4 fois plus faibles que ceux retrouvés chez les souris de phénotype *Cmv1^s* et ce, aussi tôt que deux jours post-infection (Scalzo *et al.*, 1992). Cependant, les titres hépatiques demeurent les mêmes chez les souris des deux groupes. Ce phénotype de résistance dépendante de l'organe pourrait refléter l'utilisation de deux mécanismes distincts par le système immunitaire pour arriver à contrôler l'infection. En effet, il a été démontré que le contrôle de l'infection par le MCMV dans la rate semble s'effectuer par un mécanisme dépendant de la perforine alors que dans le foie, il semble s'effectuer par un mécanisme dépendant de la synthèse d'IFN γ (Orange *et al.*, 1995; Tay et Welsh, 1997).

Par ailleurs, il a été clairement démontré que les cellules NK jouent un rôle déterminant dans la résistance au MCMV : i) les souris "beige" (déficientes pour l'activité cytotoxique NK) sont fortement susceptibles à l'infection (Shellam *et al.*, 1981), ii) l'élimination sélective des cellules NK supprime le phénotype de résistance chez les souris *Cmv1^r* (Bukowski *et al.*, 1984; Welsh *et al.*, 1990; Scalzo *et al.*, 1992), iii) le transfert adoptif de cellules NK provenant de souris *Cmv1^r* à des souris hôtes *Cmv1^s*, leur confère la protection contre le MCMV (Bukowski *et al.*, 1988; Tay *et al.*, 1999), iv) la déplétion de cellules NK chez les souris SCID sur fond B6 qui sont atteintes d'un déficit immunitaire combiné sévère abolit le phénotype de résistance (Bukowski *et al.*, 1984; Welsh *et al.*, 1986), v) l'apparition du phénotype de résistance est observée dès que les souris atteignent l'âge de trois semaines, période à laquelle les cellules NK complètent leur cycle de maturation et où l'expression des récepteurs Ly49 atteint son maximum (Williams *et al.*, 2000) et vi) plusieurs patients présentant des déficits de leur activité NK montrent une plus grande susceptibilité à l'infection par le CMV (Haliotis *et al.*, 1980; Biron *et al.*, 1989; Bonavida *et al.*, 1986). L'ensemble de ces observations démontre que les cellules NK sont responsables de la résistance au CMV. Par contre, le mécanisme par lequel le *Cmv1* contrôle l'activité NK était inconnu au moment de la réalisation de nos travaux.

Cmv1 est localisé dans le NKC (Yokoyama *et al.*, 1991; Scalzo *et al.*, 1995; Lathbury *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997b) (Figure 1). Tel que mentionné précédemment, ce complexe contient plusieurs gènes impliqués dans la régulation des fonctions des cellules NK. En plus de toutes les familles de NKR, on y retrouve également le gène *Rpm1* qui contrôle la résistance au virus ectromélie (Delano et Brownstein, 1995) et *Chok* (responsable de la résistance antitumorale attribuable aux cellules NK; Idris *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter que la souris B6, qui exprime le phénotype de résistance au MCMV, possède des allèles qui lui sont propres pour plusieurs des récepteurs Ly49. Ces observations offrent une base génétique au fait que *Cmv1* puisse réguler l'activité NK en correspondant à un gène d'une des familles de récepteurs du NKC, dont notamment la famille Ly49.

Afin de comprendre le(s) mécanisme(s) qu'utilisent les cellules NK pour permettre d'établir un phénotype de résistance virale, nous nous sommes fixé comme objectif d'identifier le gène correspondant à *Cmv1*. Les travaux qui en découlent sont présentés dans l'article I de cette thèse.

LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T EXPRIMANT DES RÉCEPTEURS NK

Dans les années'80, des récepteurs de cellules NK ont été identifiés à la surface de lignées de cellules T tumorales et de rares populations de lymphocytes T murins (Chan et Takei, 1986; Nagasawa *et al.*, 1987). Chez les souches de souris qui expriment NK1.1, il y a effectivement des populations T $CD4^+NK1.1^+$, $CD8^+NK1.1^+$ et $CD4^+CD8^+NK1.1^+$ dans tous les tissus où l'on retrouve normalement des lymphocytes T. Puisque ces populations cellulaires présentent des caractéristiques variables telles leur distribution tissulaire, leur proportion relative par rapport aux cellules T conventionnelles, leur capacité à synthétiser certaines cytokines, l'expression de marqueurs NK et d'un TCR restreint ou non par CD1d (une molécule analogue aux molécules du CMH-I) (revu par Behar et Cardell, 2000 ainsi que par McMahon et Raulet, 2001), il semblerait qu'elles puissent exercer diverses

fonctions. Il est important de noter qu'en ce qui concerne les récepteurs Ly49 chez la souris, seuls des récepteurs d'inhibition sont retrouvés à la surface de ces cellules (Ortaldo *et al.*, 1998; Coles *et al.*, 2000), alors que chez l'humain on y retrouve à la fois des NKR d'inhibition et d'activation (Ferrini *et al.*, 1994; Mandelboim *et al.*, 1996; Andre *et al.*, 1999). Toutefois, il reste à vérifier que ces formes activatrices sont fonctionnelles (Mandelboim *et al.*, 1998; Huard et Karlsson, 2000b).

La détection de cellules T NKR⁺ et NKR⁻ présentant des TCR oligoclonaux ou monoclonaux suggère que les NKR sont exprimés après les réarrangement du TCR (Ugolini et Vivier, 2000). Leur expression peut être induite par différents stimuli *in vitro* tels l'IL-2, l'IL-15 (Mingari *et al.*, 1998a; Mingari *et al.*, 1998b; Maeda *et al.*, 2001) ou encore par l'engagement du TCR (Huard et Karlsson, 2000b) et ce, dans différents contextes tels lors de l'infection par le virus de l'influenza (Assarsson *et al.*, 2000; Kambayashi *et al.*, 2000) et par la bactérie *Salmonella choleraesuis* (Nishimura *et al.*, 1999). Leur expression peut aussi être régulée à la baisse par la présence de leurs ligands (Fahlen *et al.*, 2000; Huard et Karlsson, 2000b).

Les cellules NKT restreintes par CD1d

Les cellules NKT sont définies sur la base de leur mécanisme de reconnaissance antigénique restreint par CD1d (Bendelac, 1995), une molécule essentielle à leur développement (Chiu *et al.*, 1999). Les protéines CD1 sont des molécules apparentées aux molécules du CMH-I. Elles participent à la présentation d'antigènes glycolipidiques et sont exprimées à la surface des CPA, des thymocytes et des cellules de l'épithélium intestinal (revu par Behar et Cardell, 2000). Des cinq gènes *Cd1a-e* de cette famille, seulement quatre produits (CD1a-d) sont exprimés chez l'homme et sont séparés en deux groupes : CD1a-c dans le groupe 1 et CD1d dans le groupe 2. Le premier groupe aurait comme fonction de présenter des antigènes glycolipidiques étrangers aux lymphocytes T en général, tandis que le deuxième groupe interagirait avec une population particulière de cellules T, les cellules NKT. Chez la souris chez qui seul le gène *Cd1d* est exprimé, ces cellules possèdent un TCR canonique composé de la chaîne invariante V α 14-J α 281

associée préférentiellement aux chaînes V β 2, V β 7 et V β 8 (Lantz et Bendelac, 1994; Taniguchi *et al.*, 1996). Le processus de développement des cellules NKT restreintes par CD1d est encore peu connu (revu par Kronenberg et Gapin, 2002). Malgré que le TCR V α 14-J α 281 soit essentiel au développement des cellules NKT puisqu'il est responsable de la reconnaissance de la molécule CD1d (Cui *et al.*, 1997), la signification de l'utilisation préférentielle de certaines chaînes TCR β est toujours controversée (revu par MacDonald, 2002). Deux modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer l'origine des cellules NKT. Selon le premier, ces cellules se développeraient à partir d'une sous-population minoritaire de thymocytes CD4⁺CD8⁺ qui, par réarrangement aléatoire (tout comme c'est le cas pour les cellules T conventionnelles), exprimeraient un TCR semi-invariant (revu par Bendelac *et al.*, 1997). L'engagement de leur TCR V α 14-J α 281 avec la molécule CD1d exprimée à la surface de thymocytes corticaux de nature hématopoïétique (Eberl *et al.*, 1999a; Shimamura *et al.*, 1999), permettrait leur sélection positive. Par la suite, leur maturation semblerait être notamment caractérisée par un certain processus de sélection négative des cellules CD8⁺ puisque les cellules NKT sont essentiellement soit CD4⁺ ou CD4⁻CD8⁻. Plus tardivement, on assistera à l'acquisition de marqueurs NK, tels NK1.1 ou CD69, observé dès que la souris a atteint l'âge de 7 jours (Pellicci *et al.*, 2002). Cependant, on ne sait pas si cette étape a lieu dans le thymus (voir plus loin). Quant à elle, l'interaction entre le TCR des autres cellules CD4⁺CD8⁺ et les molécules du CMH-I ou CMH-II des cellules épithéliales thymiques, permettrait la maturation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ conventionnels. C'est d'ailleurs ce modèle qui est présentement privilégié (revu par MacDonald, 2002). En effet, on a notamment démontré que les thymocytes immatures CD4⁺CD8⁺ sont des précurseurs des cellules T conventionnelles et des cellules NKT restreintes par le CD1d (Gapin *et al.*, 2001). Toutefois, puisque ce ne sont pas les mêmes facteurs qui influencent le développement des cellules NKT comparativement aux cellules T conventionnelles (revu par Kronenberg et Gapin, 2002), un deuxième modèle propose plutôt l'existence d'un précurseur distinct pour les cellules NKT (Sato *et al.*, 1999). Le TCR des cellules issues de ce précurseur devrait subir un réarrangement de façon à pouvoir interagir avec CD1d, sans quoi, faute de subir une sélection positive, elles succomberaient à une mort cellulaire programmée.

Quel que soit le processus permettant la maturation des cellules NKT, on ne peut détecter des cellules $V\alpha 14^+$ qui soit $NK1.1^+$ avant que la souris n'atteigne l'âge de 7 jours et leur nombre atteint un plateau vers l'âge de 5 à 6 semaines. Suite à leur maturation, les NKT migreraient à partir du thymus vers le foie, la rate, et la moelle osseuse, sans toutefois que l'acquisition du marqueur $NK1.1$ soit obligatoire à cette migration puisque bon nombre de cellules NKT $NK1.1^+$ y sont retrouvées. D'ailleurs, puisque la majorité des cellules NKT exportées au foie n'expriment pas $NK1.1$, il est possible que le processus de maturation de ces cellules soit complété à l'extérieur du thymus (Pellicci *et al.*, 2002). Finalement, mentionnons que puisque certains travaux rapportent la présence de cellules NKT chez les souris thymectomisées, malgré le fait que leur nombre y soit très faible, on n'a pu écarter la possibilité que ces cellules puissent se développer de façon extra-thymique (revu par Kronenberg et Gapin, 2002).

La molécule $CD1d$ aurait comme ligands certains glycolipides et dérivés du phosphatidylinositol (Joyce *et al.*, 1998), cependant leur nature demeure encore inconnue. Toutefois, les cellules NKT reconnaissent et sont activées par le glycolipide de synthèse dérivé d'éponges marines, l'alpha-galactosylcéramide (α -GalCer) lorsqu'il est associé à $CD1d$ (Kawano *et al.*, 1997). Les cellules NKT sont majoritairement de phénotype $NK1.1^+$ chez les souches qui expriment $NKR-P1C$ (Bendelac *et al.*, 1997). Elles sont essentiellement $CD4^-CD8^-$ et $CD4^+CD8^-$ (MacDonald *et al.*, 1995; Sugie *et al.*, 1996). Les cellules NKT ont le potentiel de synthétiser rapidement de grandes quantités d'IL-4 et d'IFN γ suite à leur stimulation (Bendelac *et al.*, 1994; Yoshimoto et Paul, 1994). Leur présence est surtout concentrée dans le foie, le thymus et la moelle osseuse (10 à 50% des cellules T matures, Godfrey *et al.*, 2000). Le patron d'expression des récepteurs Ly49 inhibiteurs à la surface des cellules NKT varie beaucoup selon l'organe. Par exemple, de 16 à 51% des NKT thymiques expriment Ly49A, Ly49C/I ou Ly49G2, comparativement au foie où moins de 11% des cellules NKT expriment un de ces récepteurs (MacDonald *et al.*, 1998b; Hammond *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2001). Certaines cellules NKT possèdent un TCR plus diversifié (mais pas entièrement non biaisé) et sont capables de reconnaître toute une série de ligands glycolipidiques présentés par $CD1d$ incluant des glycolipides du

soi, ce qui est un indice d'un plus large spectre de reconnaissance que celui qui leur avait été initialement attiré (Gumperz *et al.*, 2000).

Même si la molécule CD1d présente des antigènes endogènes, il n'y a aucune preuve physiologique que les cellules NKT soient capables d'auto-réactivité. Ces antigènes lipidiques endogènes pourraient notamment servir de ligands lors de la sélection du répertoire restreint par CD1d lors de l'ontogénie de ces cellules. Aussi, ils pourraient signaler que la cellule du soi n'est plus en bon état puisque plusieurs phospholipides reconnus par CD1d ne sont normalement pas exprimés en surface extracellulaire. D'autre part, les cellules T restreintes par CD1d semblent être impliquées dans plusieurs fonctions immunitaires. Les souris CD1d^{-/-} et J α 281^{-/-} qui sont déficientes en cellules NKT, présentent une incidence tumorale élevée (Cui *et al.*, 1997; Smyth *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2000; Wilson et Byrne, 2001). L'injection d' α -GalCer chez la souris, malgré qu'elle puisse mener à une destruction massive du foie (Osman *et al.*, 2000), stimule les cellules NKT de façon à ce qu'elles engendrent notamment une immunité antitumorale accrue (Nakagawa *et al.*, 2000), une protection contre la malaria murine et le virus respiratoire syncytial (Gonzalez-Aseguinolaza *et al.*, 2000; Gonzalez-Aseguinolaza *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002), une augmentation de l'activité cytotoxique des lymphocytes T (Nishimura *et al.*, 2000) ainsi qu'une protection contre l'encéphalite allergique expérimentale (Jahng *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001). Finalement une des fonctions les plus étudiées que ces cellules exercent est la prévention du diabète de type I. En effet, il a été démontré que le transfert de cellules NKT chez des souris diabétiques non obèses (NOD) déficientes pour ces cellules (Gombert *et al.*, 1996), confère une protection contre le diabète de type I initialement causé par un dérèglement de la réponse immune Th1 (Hammond *et al.*, 1998; Lehuen *et al.*, 1998). D'ailleurs, les sujets humains diabétiques possèdent un nombre réduit ou fonctionnellement altéré de cellules NKT (Wilson et Hand, 1998; Wilson et Byrne, 2001). Finalement, l'injection d' α -GalCer chez les souris NOD prévient le développement du diabète de type I (Hong *et al.*, 2001; Naumov *et al.*, 2001; Sharif *et al.*, 2001).

Plusieurs équipes ont tenté d'élucider les mécanismes d'action permettant aux cellules NKT d'exercer une activité antitumorale. Notamment, grâce à l'utilisation de souris déficientes en cellules NKT, en cellules NK ou pour la synthèse d'IFN γ , il a été démontré que la production d'IFN γ séquentielle de la part des cellules NKT et des cellules NK est essentielle à l'effet antitumoral induit par α -GalCer (Smyth *et al.*, 2002b). Aussi, cet effet antitumoral est altéré chez des souris déficientes pour la synthèse d'IL-12 (Smyth *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2002b). Grâce à ces observations, entre autres, un modèle d'activation des cellules NKT par α -GalCer a été récemment proposé (revu par Smyth *et al.*, 2002a). La première étape impliquerait la reconnaissance de CD1d par les cellules NKT, probablement de pair avec un antigène glycolipidique, reconnaissance qui pourrait également dépendre de l'engagement de CD28. Ainsi, des CPA telles les cellules dendritiques, seraient impliquées. Une première vague de cytokines serait alors synthétisée par les cellules NKT telles l'IFN γ et l'IL-4 qui induisent respectivement des réponses de types Th1 (pro-inflammatoires) et Th2 (anti-inflammatoires) (Hayakawa *et al.*, 2001). La stimulation des cellules NKT via le récepteur de l'IL-12 ou via le récepteur NK1.1 induirait préférentiellement la synthèse d'IFN γ (Terabe *et al.*, 2000). À l'opposé, l'engagement du récepteur de l'IL-18 mènerait à la synthèse d'IL-4 (Leite-De-Moraes *et al.*, 2001). Ce serait la résultante de la somme de tous ces signaux intracellulaires qui déterminerait lequel de ces deux types de cytokines prédominerait; Th1 ou Th2 (Terabe *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2001; Kadowaki *et al.*, 2001). L'interaction entre la cellule NKT et la CPA permettrait aussi l'induction de l'expression de CD40L et du récepteur de l'IL-12 à la surface des cellules NKT (Kitamura *et al.*, 1999; Tomura *et al.*, 1999). Dans un deuxième temps, l'interaction CD40L (de la cellule NKT)/CD40 (de la CPA) provoquerait l'activation de la CPA qui alors, produirait une grande quantité d'IL-12 (Eberl *et al.*, 2000). Dans un troisième temps, l'IL-12 induirait une deuxième vague de synthèse d'IFN γ de la part des cellules NKT ainsi que de la part de certaines cellules environnantes, dont les cellules NK majoritairement (Carnaud *et al.*, 1999; Eberl et MacDonald, 2000; Hayakawa *et al.*, 2001). On pense qu'ainsi l'activité antitumorale induite par α -GalCer serait principalement exercée par les cellules NK grâce à la

stimulation initiale des cellules NKT et à la participation des cellules dendritiques (revu par Smyth *et al.*, 2002a).

Les lymphocytes T CD8⁺ exprimant des récepteurs Ly49

Ces lymphocytes présentent le phénotype caractéristique des cellules mémoires (CD44^{élevé}, Ly6C⁺, CD122⁺, CD25⁻, Fas⁺) (Mingari *et al.*, 1996; Ortaldo *et al.*, 1998; Coles *et al.*, 2000). Ils possèdent un répertoire TCRαβ plutôt limité et non restreint par CD1d (Chiu *et al.*, 1999). Ils nécessitent la présence des molécules du CMH-I classiques pour leur développement (Coles *et al.*, 2000). Ils ne produisent pas d'IL-4 suite à leur stimulation, mais plutôt de l'IFNγ et du TNF-α. Ces cellules se retrouvent principalement dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Alors que 15% des thymocytes matures et <1% des splénocytes sont des NKT, les cellules T Ly49⁺CD8⁺ sont absentes du thymus mais peuvent représenter jusqu'à 5% des splénocytes. Aussi, 10% des cellules T CD8⁺ périphériques exprimeraient au moins un des récepteurs Ly49 (Ortaldo *et al.*, 1998; Coles *et al.*, 2000; Emoto *et al.*, 2000). Il semble que les cellules T Ly49⁺CD8⁺ murines (Coles *et al.*, 2000) et les cellules T KIR⁺CD8⁺ humaines s'accumulent avec l'âge, ce qui est compatible avec leur phénotype préférentiel de cellules mémoires (revu par Gumperz et Brenner, 2001). L'oligoclonalité de ces cellules (Mingari *et al.*, 1996) jumelée à l'ensemble de ces observations suggère donc que la présence de récepteurs NK d'inhibition à la surface de ce type de cellules, puisse être expliquée par une stimulation antigénique chronique telle lors d'une infection persistante ou d'une réaction auto-immune. D'ailleurs, d'autres types cellulaires stimulés de façon chronique par des antigènes du soi, dont notamment des cellules B, expriment des NKR inhibiteurs (Benlagha *et al.*, 2000; Ochi et Watanabe, 2000).

Les cellules T Ly49⁺CD8⁺ semblent être notamment impliquées dans l'immunité antitumorale et antivirale. En effet, on a isolé des cellules T CD8⁺KIR⁺ ou CD8⁺Ly49⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux (Ikeda *et al.*, 1997; Speiser *et al.*, 1999a; Speiser *et al.*, 1999b; Huard et Karlsson, 2000b; Peacock *et al.*, 2000) et viraux (Kambayashi *et al.*, 2000; Peacock *et al.*, 2000) chez l'homme et la souris. Il a aussi été démontré chez

l'homme, que l'injection de cellules T CD8⁺KIR⁺ périphériques préalablement cultivées en présence de certaines cytokines, protège contre le développement de tumeurs tout en évitant le développement de "Graft Versus Host Disease" (Hoyle *et al.*, 1998).

Puisque plusieurs travaux rapportent la présence de cellules T CD8⁺ spécifiques d'antigènes du soi et exprimant un NKR, il s'avère possible que ces cellules puissent prévenir l'établissement de réactions auto-immunitaires (Noppen *et al.*, 1998; Speiser *et al.*, 1999b; Huard et Karlsson, 2000a; Huard et Karlsson, 2000b). Par exemple, lors d'une réponse antitumorale, la présence d'un récepteur inhibiteur spécifique de molécules du CMH-I du soi à la surface de cellules T cytotoxiques pourrait prévenir la lyse de cellules du soi, tout en permettant la lyse de cellules tumorales chez qui l'expression de ces molécules est altérée.

Rôles des récepteurs Ly49 exprimés à la surface des cellules T

Les analyses de cristallographie ont démontré que les sites de liaison du récepteur Ly49A à la molécule H-2D^d sont distincts de ceux utilisés par le TCR (Natarajan *et al.*, 1999; Tormo *et al.*, 1999). Il a donc été proposé que des complexes Ly49A/H-2D^d/TCR puissent se former et qu'ainsi, les récepteurs Ly49 puissent moduler la signalisation issue de l'engagement du TCR.

Chez les souris transgéniques pour Ly49A exprimé à la surface des cellules T sur fond H-2^d (chez qui le ligand H-2D^d de ce récepteur est présent), on observe que le nombre de cellules T potentiellement autoréactives est plus élevé (MacDonald *et al.*, 1998b; Oberg *et al.*, 2000; Pauza *et al.*, 2000), que le niveau d'expression de Ly49A est diminué chez tous les types cellulaires qui l'expriment (cellules TCD4⁺ et TCD8⁺, Fahlen *et al.*, 1997; cellules T, B et NK pour la souche de souris transgénique utilisée par Held et Raulet (1997) chez qui le transgène Ly49A est exprimé chez toutes ces cellules) et que le niveau d'expression des autres NKR dont H-2D^d est le ligand, est altéré tout comme la proportion de cellules qui les expriment (Held et Raulet, 1997), tel que le modèle de "sélection" décrit précédemment, le prédit (voir la section "Développement du répertoire

de récepteurs Ly49 des cellules NK”). Il a été proposé que les pathologies auto-immunes inflammatoires observées chez ces souris pourraient être la conséquence de l’expression précoce de Ly49A, qui perturberait le processus de sélection négative des lymphocytes (Fahlen *et al.*, 2000; Pauza *et al.*, 2000; Hanke et Raulat, 2001).

L’engagement de Ly49A avec son ligand réduit la sécrétion d’IL-2 chez les cellules EL-4 lorsqu’elles sont mises en présence de cellules cibles H-2D^{d+} (Ortaldo *et al.*, 1998) et inhibe la hausse du niveau d’expression de CD69 normalement induite par la stimulation du TCR (Coles *et al.*, 2000). D’autre part, l’expression de Ly49G2 à la surface des lymphocytes CD8⁺ T spécifiques pour le virus de la chorio-méningite lymphocytaire (LCMV), altère leur capacité à lyser les cellules infectées exprimant le ligand de ce récepteur (Peacock *et al.*, 2000). Il a été démontré que les cellules NKT murines restreintes par CD1d peuvent être inhibées par l’engagement de Ly49A et Ly49G2 (Ortaldo *et al.*, 1998) et ce, tant au point de vue de leur prolifération (Held *et al.*, 1996a; Hanke *et al.*, 1999; Oberg *et al.*, 2000), de leur synthèse de cytokines (Ortaldo *et al.*, 1998; Brawand *et al.*, 2000) que de l’induction de leur activité cytotoxique (Zajac *et al.*, 1999).

L’expression des molécules Ly49 à la surface des lymphocytes T CD8⁺ pourrait simplement être la conséquence d’une stimulation antigénique prolongée ou chronique. En effet, ces molécules ne sont pas exprimées à la surface des cellules T CD8⁺ naïves, mais seulement à la surface des cellules T CD8⁺ matures présentant un phénotype de cellules mémoires (Coles *et al.*, 2000). Ainsi, ces molécules pourraient permettre d’éviter une hyper-stimulation de la cellule. Aussi, les molécules Ly49 pourraient avoir comme rôle d’accroître l’efficacité de la réponse immune. Effectivement, l’expression des NKR peut être induite à la surface d’un grand nombre de cellules T CD8⁺ suite à une stimulation virale ou tumorale (Blaser *et al.*, 1998; Diefenbach *et al.*, 2000; Kambayashi *et al.*, 2000; Slifka *et al.*, 2000). Donc, peut-être qu’en haussant le seuil de réponse du TCR, leur rôle serait d’assurer que seuls les antigènes de haute affinité ou présents en haute concentration, puissent activer ces cellules. Aussi, en élevant le seuil de réponse du

TCR, ces récepteurs pourraient protéger de l'apoptose les cellules T activées, qui normalement, sont majoritairement éliminés suite à une réponse immune de façon à maintenir l'homéostasie du système. Les cellules T activées qui survivent à cette étape constituent le bassin de cellule T mémoires (revu par Kramer, 2000). D'autre part, il a aussi été observé que les signaux conséquents de l'engagement des récepteurs Ly49 d'inhibition peuvent être cumulatifs lorsqu'ils sont exprimés à la surface de lymphocytes T (Hanke et Raullet, 2001). Toutefois, dans certaines conditions, ces signaux inhibiteurs peuvent être surpassés par ceux du TCR (Oberg *et al.*, 2000; Pauza *et al.*, 2000).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats démontre que les différentes réponses de la cellule T sont régulées de façon quantitative par la résultante de la somme de l'ensemble des signaux provenant notamment du TCR et des récepteurs Ly49 d'inhibition.

Chapitre 2 :

Article I : Assessment of *Cmv1* candidates by genetic mapping and *in vivo* antibody depletion of NK cell subsets.

MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE I

L'importance du rôle que jouent les cellules NK dans la résistance contre le MCMV est connue depuis longtemps. L'équipe de Shellam a été la première à démontrer qu'un gène de résistance, nommé *Cmv1*, contrôle la réplication du MCMV dans la rate et ce, par l'entremise des cellules NK (Bancroft *et al.*, 1981). Les souris consanguines de différentes souches résistent ou non à l'infection selon qu'elles expriment l'allèle de résistance *Cmv1^r* ou l'allèle de susceptibilité *Cmv1^s* (Scalzo *et al.*, 1990). La mesure des titres infectieux retrouvés chez des souris recombinantes consanguines et rétro-croisées a permis de localiser *Cmv1* dans le NKC (Scalzo *et al.*, 1992; Scalzo *et al.*, 1995). Cette observation soulève l'hypothèse que *Cmv1* puisse correspondre à un des gènes des récepteurs des cellules NK localisés dans cette portion du chromosome 6. L'équipe du Dr. Vidal de l'Université d'Ottawa, s'intéressait justement à préciser la localisation génétique du gène *Cmv1* et à identifier la molécule qui lui correspond. Pour ce faire, cette équipe a produit un grand nombre de souris issues de rétro-croisements de souris hybrides résistantes avec des souris parentales susceptibles [(BALB/c x B6)_{F1} x BALB/c] et [(A/J x B6)_{F1} x A/J]. Ainsi, elle a pu déterminer par l'analyse de la ségrégation génétique de plusieurs marqueurs polymorphiques et par la détermination du phénotype de résistance de chaque souris présentant un événement de recombinaison dans la région de *Cmv1*, que ce dernier et *Nkl.1* étaient deux gènes distincts (Depatie *et al.*, 1997). Elle a aussi localisé *Cmv1* à moins de 0,7 cM de la famille des gènes *Ly49* (Depatie *et al.*, 1997), ce qui faisait des membres de cette famille des candidats potentiels pour ce gène de résistance, une hypothèse également postulée par l'équipe de Scalzo (Scalzo *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997b; Forbes *et al.*, 1997).

Au moment d'entreprendre le travail exposé dans l'article I, 9 gènes *Ly49(a-i)* avaient été clonés chez la souris B6 résistante à l'infection par MCMV (Wong *et al.*, 1991; Brennan *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1994; Brennan *et al.*, 1996). L'homologie existante entre les différentes molécules de cette famille fait en sorte que la majorité des anticorps anti-Ly49 produits reconnaissent un épitope commun à plus d'un récepteur. À titre d'exemple, le

seul AcMo dirigé contre un récepteur Ly49 activateur alors disponible était le 12A8 qui reconnaît Ly49D mais aussi Ly49A (Mason *et al.*, 1996; Takei *et al.*, 1997). De plus, aucun AcMo dirigé contre Ly49B, Ly49E, Ly49F et Ly49H n'était disponible. Ainsi, à l'époque, seulement trois des produits des gènes de la famille *Ly49* étaient reconnus par des AcMo dirigés contre un épitope spécifique d'un seul récepteur : A1 produit par le laboratoire de Allison qui ne reconnaît que l'allèle B6 de Ly49A (Nagasawa *et al.*, 1987; Yokoyama *et al.*, 1990), 4LO3311 produit par notre laboratoire qui reconnaît Ly49C (Lemieux *et al.*, 1991; Brennan *et al.*, 1996; Gosselin *et al.*, 1997) et 4LO439, également produit par notre équipe et qui ne réagit qu'avec l'allèle B6 de la molécule Ly49G2 (Lemieux *et al.*, 1991; Takei, communication personnelle). Les études faisant appel à l'utilisation d'AcMo ne pouvaient donc cibler qu'un nombre limité de récepteurs Ly49. Notons que nous avons également produit au laboratoire l'AcMo 5GA5 (Paré, 1995) qui reconnaît les molécules Ly49C et Ly49I (Takei, communication personnelle). Il est important de noter que les récepteurs Ly49C et Ly49I possèdent dans leur queue cytoplasmique un ITIM ainsi qu'un acide aminé chargé dans leur portion transmembranaire, ce qui posait certaines interrogations quant à leur fonction.

Donc, par un intérêt commun de parvenir à identifier d'une part la molécule codée par *Cmv1^r* et d'autre part, d'établir le rôle des récepteurs Ly49 des cellules NK dans la résistance antivirale, une collaboration a été établie entre les laboratoires des Dr Vidal et Lemieux. La problématique de ce projet était qu'un récepteur des cellules NK de la souris B6 est apte à reconnaître l'infection par le MCMV et par conséquent, provoquait de façon quelconque l'enclenchement de l'activité des cellules NK qui est responsable de la résistance à cette infection virale. L'hypothèse de ce travail était que ce récepteur appartienne à la famille Ly49. En effet, le polymorphisme allélique du *Cmv1* pouvait être expliquer de différentes façons. Par exemple, un récepteur Ly49 activateur exprimé à la surface de cellules NK des souris résistantes ou encore un récepteur Ly49 inhibiteur exprimé à la surface de cellules NK des souris susceptibles pourrait reconnaître une molécule dont l'expression est induite par l'infection, un peptide viral présenté dans le contexte des molécules du CMH-I ou encore, une protéine virale et ainsi, enclencher une

cascade de signaux menant respectivement, à l'attaque ou à l'épargne des cellules infectées. Aussi, un récepteur Ly49 inhibiteur exprimé à la surface de cellules NK des souris résistantes pourrait, en reconnaissant une molécule soluble sécrétée par le virus, être dans l'impossibilité d'interagir avec son ligand naturel et d'enclencher sa cascade d'inhibition habituelle, ce qui aurait comme conséquence de permettre l'activation de ces cellules. L'importance des effets pathologiques causés par l'infection du MCMV chez les souris susceptibles, nous a empêchée de procéder à la purification adéquate de leurs cellules NK. Nous avons donc procédé à l'analyse de ces cellules chez les souris résistantes et ce, pour les récepteurs inhibiteurs Ly49A, Ly49C, Ly49C/I et Ly49G2.

Les objectifs que nous nous étions fixés étaient de i) restreindre l'intervalle dans lequel se trouve le gène *Cmv1* par cartographie génétique; ii) évaluer par cytométrie en flux comment le niveau d'expression des récepteurs Ly49 et la taille des populations de cellules NK qui les expriment sont modulés au cours de l'infection par le MCMV et iii) évaluer l'implication de sous-populations de cellules NK exprimant différents récepteurs Ly49 dans la résistance au MCMV par leur déplétion sélective chez des souris de phénotype *Cmv1*' et ce, dans le but d'abolir ce phénotype. À ce titre, rappelons que l'utilisation de l'AcMo anti-NK1.1 avait permis d'identifier que les cellules NK sont impliquées de façon importante dans l'établissement du phénotype de résistance au MCMV et ce, malgré que le récepteur NK1.1 n'en soit pas lui-même responsable (Scalzo *et al.*, 1992).

ARTICLE I :
ASSESSMENT OF *Cmv1* CANDIDATES BY GENETIC MAPPING AND *IN VIVO* ANTIBODY
DEPLETION OF NK CELL SUBSETS.

Chantal Depatie*¹, Anick Chalifour*², Catherine Paré², Seung-Hwan Lee³, Silvia Vidal³
et Suzanne Lemieux².

¹ Département de Biochimie, Université McGill, Montréal, Québec, H3G 1Y6, Canada

² Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du
Québec, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

³ Département de Biochimie, Microbiologie et Immunologie, Université d'Ottawa,
Ottawa, Ontario, K1H 8M5, Canada

* ont contribuées de façon équivalente à cet article

Le gène *Cmv1*, localisé sur le chromosome 6 murin, contrôle la résistance à l'infection par le MCMV. Nous avons préalablement démontré que *Cmv1* est étroitement lié aux membres du NKC qui inclut notamment les gènes de la famille *Ly49*. Afin d'évaluer la possibilité que l'un des gènes du NKC puisse occuper ce locus de résistance, nous avons dans un premier temps étudié les patrons de co-ségrégation de *Cd94*, *Nkg2d*, *Ly49a*, *Ly49c* et *Ly49g* par rapport à *Cmv1*, chez des souris issues de rétro-croisements de souris hybrides résistantes avec des souris parentales susceptibles. La séquence des gènes et les distances (en cM) qui les séparent sont les suivantes : centromère-*Cd94/Nkg2d*-(0,05)-*Ly49a/Ly49c/Ly49g/Cmv1*-(0,3)-*Prp/Kap/D6Mit13/111/219*. Ce résultat exclut *Cd94* et *Nkg2d* comme candidats mais par contre, situe les gènes *Ly49* dans l'intervalle génétique minimal de *Cmv1*. Dans un deuxième temps, nous avons examiné l'expression de différents récepteurs *Ly49* à la surface des cellules NK au cours de l'infection par le MCMV chez la souris. La proportion des cellules NK *Ly49C⁺* et *Ly49C/I⁺* diminue alors que celle des cellules *Ly49A⁺* et *Ly49G2⁺* demeure constante. Étonnamment, le niveau d'expression de *Ly49G2* augmente lors de l'infection. Ces résultats suggèrent que les différentes sous-populations NK puissent avoir différents rôles dans la régulation de l'infection par le MCMV. Troisièmement, nous avons éliminé de façon sélective

différentes sous-populations NK préalablement à l'infection chez la souris. Les traitements ciblant un seul récepteur n'ont pas affecté le phénotype de résistance suggérant que les sous-populations exprimant Ly49A, Ly49C, Ly49G2 ou Ly49C/I ne jouent pas de rôle majeur dans la résistance contre le MCMV, ce qui par conséquent exclut les gènes respectifs comme candidats pour le *Cmv1*. Toutefois, les souris ayant subi des traitements ciblant plusieurs récepteurs, démontrent un phénotype de type intermédiaire. Qu'une population de cellules NK résiduelle exprimant un autre récepteur Ly49 ou qu'une molécule codée par un gène encore inconnu puisse être responsable du phénotype de résistance sont les deux hypothèses discutées.

Article publié dans : *International Immunology* (1999). 11: 1541-1551.

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

Depatie C, Chalifour A, Paré C, Lee SH, Vidal SM, Lemieux S. Assessment of *Cmv1* candidates by genetic mapping and in vivo antibody depletion of NK cell subsets. *Int Immunol*. 1999 Sep;11(9):1541-51.

Chapitre 3 :

Article II : Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with TCR-mediated activation.

MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE II

Pour que l'on puisse assister à une activation des cellules T, il est bien connu qu'un antigène doit être abondant et de forte affinité (Ashton-Rickardt et Tonegawa, 1994). Ainsi, la force du signal que transmet le TCR à l'intérieur de la cellule T suite à son engagement, doit atteindre un certain seuil afin qu'il puisse engendrer une conséquence fonctionnelle perceptible. Par analogie, on peut s'attendre à ce que le même principe s'applique aux récepteurs des cellules NK suite à leur interaction avec les molécules du CMH de classe I. Puisque c'est la résultante de la somme des signaux des récepteurs activateurs et inhibiteurs qui détermine l'état d'activation d'une cellule, l'avidité de chacun de ces récepteurs contribuerait à la force du signal qu'ils transmettent et par conséquent, à la réponse cellulaire.

Au moment où nous avons entamé ce projet, peu d'études fonctionnelles avaient exploré directement l'impact de l'avidité des récepteurs de la famille Ly49 sur leur capacité à transmettre un signal. Il avait déjà été démontré chez les cellules NK que l'intensité de la signalisation produite par le récepteur Ly49A suite à son engagement, est en corrélation avec son niveau d'expression. Par exemple, lorsque le récepteur Ly49A est faiblement exprimé à la surface des cellules NK, la molécule H-2D^d qui est son ligand, doit être exprimée à de hauts niveaux à la surface des cellules cibles pour qu'elles puissent résister à l'attaque par les cellules NK. En fait, le niveau d'expression du récepteur Ly49A inhibiteur détermine le niveau d'expression de ligands nécessaire pour que la signalisation engendrée suite à leur interaction soit de puissance suffisante pour pouvoir interférer de façon significative avec les cascades d'activation de la cellule (Olsson *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1997; Olsson-Alheim *et al.*, 1997). Toutefois, ces analyses n'ont été effectuées que pour des niveaux d'expression faibles et élevés ou bien, établis de façon arbitraire. Ainsi, faute de clones représentatifs des niveaux d'expression de l'ordre de ceux qui prévalent *in vivo*, aucune courbe de corrélation entre la capacité inhibitrice de ces récepteurs et leur niveau d'expression physiologique, n'a pu être établie. De plus, malgré qu'il ait été démontré que les récepteurs Ly49A et Ly49G2 peuvent inhiber

l'activation des cellules T stimulées via leur TCR (Held *et al.*, 1996a; Ortaldo *et al.*, 1998; Hanke *et al.*, 1999), aucune étude n'avait rapporté l'impact que pouvait avoir le niveau d'expression de ces récepteurs sur leur capacité de signalisation lorsqu'ils sont exprimés à la surface de cellules T.

Seule l'étude de Hanke et collaborateurs avait tenté à cette époque de mettre en lumière une relation entre l'affinité de molécules Ly49 pour leurs ligands et leur force d'inhibition (Hanke *et al.*, 1999). Des cellules T exprimant soit le récepteur Ly49A ou soit Ly49G2 inhibiteur (isolées de souris transgéniques pour ces récepteurs), mises en présence de cellules spléniques irradiées de différents haplotypes, voient leur prolifération inhibée de façon plus ou moins importante selon l'affinité avec laquelle ces récepteurs reconnaissent les ligands présents. Toutefois, ces résultats sont sujets à discussion puisque l'affinité qui a été déterminée pour chacun de ces récepteurs par la force d'adhésion des cellules T à des cellules blastiques de différents haplotypes, n'est pas toujours en corrélation directe avec l'intensité de la prolifération induite.

Comme il a déjà été mentionné, l'étude de la contribution signalétique d'un membre donné de la famille Ly49 à l'état d'activation global d'une cellule est laborieuse du fait que plusieurs membres de cette famille sont exprimés sur une même cellule et qu'ils peuvent avoir des ligands communs.

Nous avons donc choisi de construire un modèle d'étude où seul le récepteur d'intérêt peut être engagé par son ou ses ligands naturels et transmettre un signal d'inhibition. Nous avons donc transfecté l'ADN complémentaire de molécules Ly49 murines dans un lymphome T CD4⁺ humain nommé Jurkat. Les cellules Jurkat avaient déjà été utilisées avec succès pour analyser d'autres récepteurs des cellules NK, démontrant ainsi que les cascades signalétiques de ces cellules sont suffisamment similaires pour permettre leur utilisation dans ce type d'étude (Ortaldo *et al.*, 1999b). Nous avons produit une série de clones exprimant ces molécules à des niveaux se situant à l'intérieur de la gamme des niveaux retrouvés chez les souris B6 (H-2^b) et BALB/c (H-2^d). Les clones de cellules T

exprimant Ly49A ou Ly49C étaient stimulés à l'aide de CPA et l'activation du NF-AT ainsi que la synthèse d'IL-2 étaient les paramètres utilisés pour nous indiquer le niveau d'activation des cellules T. Les CPA présentent à la fois des molécules du CMH-II qui engageaient le TCR des cellules T par pontage à l'aide d'un superantigène (SEE) que nous rajoutions, ainsi que des molécules du CMH-I qui engageaient le récepteur Ly49 inhibiteur des cellules T. Puisque le signal d'activation était constant dans ce système, il nous fut donc possible d'effectuer une analyse semi-quantitative de la modulation du signal d'inhibition.

L'hypothèse du travail exposée dans l'article II était que l'avidité des récepteurs Ly49A et Ly49C détermine leur capacité à interférer avec l'activation des cellules T stimulées via leur TCR. Les objectifs que nous nous étions fixés afin de vérifier cette hypothèse étaient de : i) évaluer la capacité de Ly49C à inhiber la cascade d'activation initiée par la stimulation du TCR, ii) déterminer s'il existe une corrélation entre le niveau d'expression des récepteurs Ly49A et Ly49C et leur capacité à inhiber l'activation consécutive de la stimulation du TCR et iii) déterminer si l'affinité de ces récepteurs pour leurs ligands est en relation avec leur capacité à inhiber cette activation.

ARTICLE II :
RECEPTOR/LIGAND AVIDITY DETERMINES THE CAPACITY OF LY49 INHIBITORY
RECEPTORS TO INTERFERE WITH TCR-MEDIATED ACTIVATION.

Anick Chalifour, Joanne Roger, Suzanne Lemieux et Pascale Duplay.

Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

Afin d'évaluer comment le niveau d'expression des récepteurs Ly49 inhibiteurs et l'affinité qu'ils ont pour leurs ligands influencent leur capacité à transmettre un signal, nous avons développé une série de clones de cellules T humaines exprimant différents niveaux des récepteurs Ly49A et Ly49C. Nous avons d'abord établi la capacité des récepteurs transfectés à inhiber l'activation du TCR engagé par le SEE en présence de cellules présentatrices d'haplotypes H-2^b ou H-2^d. Dans le système utilisé, l'activation du NF-AT et la synthèse d'IL-2 étaient les paramètres indiquant le niveau de stimulation du TCR. Nous montrons que l'intensité de l'inhibition induite suite à l'interaction Ly49A/H-2D^d est en corrélation avec le niveau d'expression du récepteur et ce, jusqu'à un certain niveau au-dessus duquel, l'engagement du récepteur Ly49A ne parvient pas à inhiber davantage la stimulation du TCR. Ce système nous a aussi permis de déterminer l'affinité relative des récepteurs Ly49A et Ly49C pour leurs ligands. Parmi les molécules du CMH-I d'haplotype H-2^d, H-2D^d est le seul ligand fonctionnel de Ly49A. Aucune observation ne permet de croire que l'engagement de Ly49A avec une des molécules du CMH-I de l'haplotype H-2^b puisse engendrer un signal d'inhibition et ce, même à de très hauts niveaux d'expression du récepteur. De plus, nous montrons que seule la molécule H-2K^b de l'haplotype H-2^b engendre une conséquence fonctionnelle suite à son interaction avec Ly49C et que les molécules de l'haplotype H-2^d représentent des ligands de plus faible affinité pour ce récepteur. En résumé, selon l'affinité relative des récepteurs Ly49 pour leurs ligands, la modulation de leur niveau d'expression peut être déterminante pour la régulation de la réponse des lymphocytes T qui les expriment.

Article en révision : *Immunology*

Summary

The specificity and the relative affinity of many Ly49 receptors for MHC-I ligands have been studied in detail in various adhesion and binding assays. However, how the level of cell surface expression of a given Ly49 receptor and its ligand affinity influence the strength of the inhibition signal is not well documented. To address this issue, we developed a series of human Jurkat T cell transfectants expressing the whole range of Ly49A and Ly49C levels found *in vivo* on NK and T cells and evaluated their capacity to alter superantigen-induced NF-AT activation and IL-2 production. We show that the strength of the inhibition induced by Ly49A/H-2D^d interaction correlates with Ly49A density up to a certain level where increasing expression does not further inhibit significantly TCR-induced activation. This system represents also a valuable tool to determine the relative strength of the inhibitory signals of Ly49 receptors following their interactions with different ligands. Even at high expressing levels, there was no evidence that engagement of Ly49A with H-2^b class I molecules provides inhibitory signal. Moreover, we showed that functional inhibitory interactions of Ly49C with H-2^b class I molecules were only due to H-2K^b and that H-2^d represent lower affinity ligands for Ly49C than H-2^b. Therefore, depending on the relative affinity of Ly49 receptors for their ligands, the modulation of their expression level will be determinant for the functional outcome of activated T cells.

Introduction

Ly49 receptors are C-type lectin-like molecules encoded by a multigene family that, in the mouse, is clustered within the NK gene complex on the chromosome 6.¹ These receptors have either activating or inhibitory properties. The cytoplasmic domain of Ly49 inhibitory receptors includes an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) that has the capacity to bind the Src homology 2 domain-containing phosphatase SHP-1 and may be SHP-2.² In NK cells, co-engagement of a Ly49 inhibitory receptor together with an activating receptor results in an interruption of activation signaling. By contrast, Ly49 activating receptors, through their association with DAP12, transmit positive signals to NK cells.³

Ly49 receptors were formerly found to be expressed on overlapping NK cell subsets.^{1,4-6} Expression of some inhibitory Ly49 receptors was further detected on several subsets of T lymphocytes.^{7,8} The two main subsets of Ly49⁺CD3⁺T cells are: NKT cells expressing a restricted TCR repertoire that recognizes glycolipid antigens presented by CD1d and CD8⁺T cells bearing surface markers of memory phenotype.

While the role of Ly49 receptors on killing and cytokine production capacities of NK cells is well documented, functions of most Ly49 inhibitory receptors on T cells remain poorly defined. In Ly49A and Ly49C transgenic mice, in the presence of cognate MHC class I ligands, expression of the transgenes on T cells is down-modulated⁹⁻¹², autoimmune inflammatory diseases appeared^{11,13,14} and impaired development of liver NK1.1⁺ T cells was detected.^{9,12}

Several TCR-induced responses are inhibited through Ly49-mediated signaling. This includes cell proliferation^{11,14-18}, killing of specific targets^{13,18,19}, cytokine production²⁰ and up-regulation of the early activation marker CD69.²¹ Additive inhibitory signals due to engagement of two Ly49 receptors were detected in Ly49A/G2 double-transgenic mice.¹⁴ The inhibitory signals delivered by Ly49 receptors can be overcome by a strong activation signal indicating that the response of T cells is quantitatively regulated by the relative strength of opposite TCR- and Ly49-mediated signals.^{11,18} Furthermore, we recently reported that signaling through Ly49A protected a T cell hybridoma from TCR-induced apoptosis.²⁰ Therefore, the interference of Ly49 receptor-mediated signals with TCR-mediated activation may not only result in the alteration of TCR sensitivity threshold but also lead to the survival of Ly49 expressing T cells.

Specificity and/or relative affinity of several Ly49 family members for MHC class I ligands have been extensively studied in various adhesion or binding assays with cells expressing MHC class I molecules^{1,17,22-31}, isolated MHC class I molecules³² or soluble MHC class I tetramers.^{17,33,34} However, only a few of Ly49 inhibitory receptor/ligand interactions have been tested in functional assays. Moreover, it is important to note that all Ly49 receptors do not signal with the same efficiency.^{17,35}

The overall strength of Ly49/ligand interaction is likely to be affected by the affinity and the expression level of the receptor and the ligand on individual cells.³⁶⁻³⁸ To address this issue, we developed a series of human Jurkat T cell transfectants expressing the whole physiological range of Ly49 expression found on freshly isolated splenic NK and T cells. Since mouse T cells express simultaneously multiple Ly49 family members³⁵ and likely other receptors capable of binding MHC class I³⁹, this simplified system was designed to measure the inhibition signal generated by a given Ly49 receptor upon binding to its

MHC class I ligand. Our results show that the strength of Ly49 inhibitory properties depends on receptor expression level and its affinity for a cognate ligand.

Materials and Methods

Mice

BALB/c, H-2^d and B6, H-2^b inbred mice were purchased from Charles River Canada Inc. (St-Constant, QC).

Antibodies

The following hybridomas were obtained from ATCC (Rockville, MD): 20-8-4S, anti-H-2K^d α 1/ α 2^{1, 24}, SF1-1.1.1, anti-H-2K^d α 3⁴⁰; 34-5-8S, anti-H-2D^d α 1/ α 2; 34-2-12S, anti-H-2D^d α 3; 30-5-7S, anti-H-2L^d α 1/ α 2; 28-14-8S, anti-H-2L^d α 3⁴¹; AF6-88.5.3, anti-H-2K^b (the epitope recognized by this mAb is sensitive to changes in α 1, α 2 and α 3 domains)⁴²; 53-6.72, anti-CD8 and OKT3, anti-CD3 ϵ . Except for clone 53-6.72 that produces rat IgG2a, all other Abs produced by these hybridomas are mice IgG2a. Hybridomas producing anti-CD4 (MT4, rat IgG2b), anti-Ly49A (A1, mouse IgG2a)⁴³ and anti-H-2D^b (α 1, B22-249, mouse IgG2a)⁴⁴ mAbs were kindly provided by Dr. E. Potworowski (INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC), Dr. J. P. Allison (UC, Berkeley, CA) and Dr. U. Hämmerling (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY, NY), respectively. Anti-Ly49C (4LO3311, mouse IgG3) and anti-Ly49C/I (5GA5, hamster IgG) mAbs recognizing epitopes in the stalk and CRD of the extracellular portion of the receptor, respectively, have been described.⁴⁵⁻⁴⁷ These mAbs were purified from hybridoma supernatants using Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia Biotech, Baie D'Urfé, QC). F(ab')₂ fragments were generated by pepsin digestion and undigested mAbs were absorbed over Protein A-Sepharose. Purity of F(ab')₂ fragments was verified by SDS-PAGE. Fluorescein-conjugated goat affinity purified F(ab')₂ fragment to mouse IgG, goat anti-mouse IgG H+L and Fc γ fragment specific mAbs, were purchased from Cappel

(Scarborough, ON) and Jackson ImmunoResearch Laboratories (Mississauga, ON) respectively.

T cell clones and Cell lines

The Jurkat human T cells, clone J77.6, have been described previously.⁴⁸ The cDNAs encoding Ly49A and Ly49C were generously provided by Dr. F. Takei (The Terry Fox Laboratory, British Columbia Cancer Research Center, Vancouver, BC). Ly49 cDNAs constructs were subcloned into pSR α puromycin. J77.6 were transfected with 20 μ g of pSR α -Ly49A or pSR α -Ly49C using a Gene Pulser (Bio-Rad, Mississauga, ON) set at 250 mV and 960 microfarads. Drug-resistant cells were cloned by limited dilution in puromycin-containing medium. Ly49A and Ly49C cell surface expression was screened by flow cytometry analysis.

Preparation of APCs

APCs were isolated by a negative selection procedure. Briefly, spleen cells were incubated for 20 min on ice with anti-CD4, then for 30 min with anti-CD8 mAbs. CD4⁺ and CD8⁺ cells were removed with sheep anti-rat IgG-coated magnetic beads (DynaL, Great Neck, NY). Before being used as APCs, T cell-depleted splenocytes were cultured overnight at a density of 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 5×10^{-5} M 2-ME, and 10 μ g/ml LPS.

Flow Cytometry analysis

Cells (2×10^5 /sample) suspended in PBS containing 1% FBS were first incubated with saturating concentration of mAb at 4°C for 30 min. After two washes, cells were incubated with FITC-conjugated secondary Abs at 4°C for 30 min. After washing, cells were analyzed on a Epics XL-MCL flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL).

The mean fluorescence intensity (MFI) was established on a logarithmic scale. Data analysis using XL software, version 1.5, was based on the collection of 5000-10000 events per sample.

Stimulation of Jurkat T cells and IL-2 production

J77.6 wild type (WT) or Ly49 transfectants (2×10^5) were stimulated 24 h with equal numbers of H-2^b or H-2^d APCs and SEE superantigen (Toxin Technology, Sarasota, FL). Unless otherwise mentioned, SEE was added at 3.3 $\mu\text{g/ml}$, in the absence or in the presence of saturating concentrations of anti-receptor (F(ab')₂ mAb fragments) or anti-ligand (MHC class I-specific) mAbs. T cell activation was assessed by NF-AT activation (see below) and IL-2 production using the IL-2-dependent cell line CTLL-2 as described previously.⁴⁹ [³H]thymidine incorporation was counted in a MicroBeta Trilux liquid scintillation counter (Wallac, Turku, Finland). In absence of SEE, less than 0.001 relative light unit (RLU) for NF-AT activity and 10000 cpm for IL-2-dependent CTLL-2 proliferation were obtained irrespective of the APCs haplotype or Jurkat clone present (data not shown).

Transient transfection and luciferase assays

Jurkat cells (1×10^6) were transfected with 2.5 μg NF-AT-firefly Luciferase (kindly provided by Dr. O. Acuto, Institut Pasteur, Paris, France) and 0.5 μg TK-*Renilla* Luciferase constructs (Promega, Madison, WI) using FuGENETM Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Laval, QC). After 24 h, cells were stimulated with SEE as described above. Maximal stimulation was obtained by a combination of PMA (10 ng/ml) and ionomycin (1 μM). Cells were then lysed and assayed for luciferase activity using the Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) and a luminometer

(Berthold, LUMAT LB 9507, Bundoora, Australia). The NF-AT-firefly luciferase values were normalized based on the constitutive *Renilla* luciferase activity.

Results

Inhibition of NF-AT activation and IL-2 secretion in SEE-stimulated Jurkat T cell transfectants upon Ly49A binding to H-2D^d

We generated a series of stable Jurkat transfectants expressing different levels of Ly49A and Ly49C (Table 1). To minimize variations of TCR-induced activation, only clones expressing equivalent levels of CD3 at their cell surface were selected (data not shown). Flow cytometry analysis of Ly49A and Ly49C transfectants revealed respectively a 10 and 2 fold variation between clones with the lowest and highest expression levels (Table 1). These transfectants are suitable for functional studies as the range of their Ly49 receptor expression levels matches with those found on NK and T cells in H-2^b and H-2^d mice. In fact, in preliminary experiments, we established that C57BL/6 N^{WNA} CD4⁻CD8⁻ spleen cells stained with CD3-FITC, NK1.1-PE and biotinylated Ly49A and Ly49C mAbs and streptavidin Cy-ChromeTM conjugate contained 91.4 ± 1.0 percent of CD3⁻NK1.1⁺ (NK) cells and 8.8 ± 1.6 percent of CD3⁺NK1.1⁺ cells that correspond to double negative (DN) NK1.1⁺ T cells (mean \pm SD of 4 experiments). Analysis of gated CD3⁻NK1.1⁺ and CD3⁺NK1.1⁺ cells revealed that the levels of expression of Ly49A and Ly49C receptors were similar on these two cell subsets (data not shown). In other experiments where CD4⁺ or CD8⁺ T cells were selectively depleted, we observed that the levels of expression of Ly49A and Ly49C receptors on gated NK1.1⁺CD8⁺ or NK1.1⁺CD4⁺ were identical to those measured on NK and DN NK1.1⁺ T cells (data not shown). We thus concluded that measuring the levels of expression of Ly49 receptors on N^{WNA} CD4⁻CD8⁻ spleen cells containing a mixture of NK and DN NK1.1⁺ T cells would be representative of the physiological range of these receptors on normal cells (Figure 6/Annexe C).

To test whether Ly49A/ligand interaction interferes with superantigen-induced activation of Jurkat cells, we compared Staphylococcal enterotoxin E (SEE)-induced NF-AT activation in clones expressing Ly49A in the presence and in the absence of anti-Ly49 receptor or anti-ligand blocking mAbs. Anti-Ly49 F(ab')₂ mAb fragments were used to avoid crosslinking of Ly49 and therefore Ly49-mediated signaling. Absence of FcR on Jurkat cells allowed us to use complete Abs for ligand-directed blocking. T cell-depleted murine spleen cells were used as stimulator cells to provide on the same cells MHC class II molecules required for SEE presentation and MHC class I ligands of Ly49 inhibitory receptors. In all experiments presented below, the parental and the transfected Jurkat cell lines did not respond to APCs in the absence of SEE, regardless of the presence of anti-receptor or anti-ligand mAbs (see Methods). Inhibition indexes were determined as SEE-induced response obtained in presence of the anti-Ly49 receptor or anti-ligand mAbs divided by response obtained in absence of mAbs.

The clone that expresses the highest level of Ly49A, JAX1, was chosen to determine optimal blocking mAb concentrations. As shown in Figure 1A, the response was enhanced in a dose dependent manner and to the same extent with either anti-Ly49A or anti-H-2D^d mAbs. This result is in agreement with the fact that H-2D^d is the only ligand for Ly49A in the H-2^d haplotype. Accordingly, in the presence of various combinations of $\alpha 1/\alpha 2$ and $\alpha 3$ domain-specific anti-MHC class I mAbs, no Ab other than anti-H-2D^d $\alpha 1/\alpha 2$ domain-specific mAb had the capacity to reverse the Ly49-mediated inhibition of NF-AT response to the level reached with anti-Ly49A receptor mAb (Fig. 1B). None of these mAb combinations affected significantly SEE-induced activation of the parental Jurkat cell line (Fig. 1B).

We used CTLL-2 proliferation assays to evaluate whether Ly49-mediated inhibition of SEE-induced T cell activation can also be assessed at the level of IL-2 secreted in culture supernatants. As shown in Fig. 1C, inhibition of IL-2 production was restored in the presence of anti-Ly49A or anti-H-2D^d mAbs, indicating that upon engagement with its ligand on APCs Ly49A has the capacity to alter the SEE-induced T cell activation pathway leading to IL-2 production. Altogether, these results validated our assay system in the context of a well-known inhibitory receptor/ligand interaction.

Ly49A-mediated inhibition of NF-AT activation following SEE-induced T cell stimulation correlates with the expression level of the inhibitory receptor

To evaluate the relationship between Ly49A-mediated inhibition and TCR signaling, we compared NF-AT activation in the parental and Ly49A-transfected Jurkat cell lines following their stimulation with varying concentrations of SEE. For all cell lines, there was a proportional increase in NF-AT activation with increasing concentrations of SEE (Fig. 2). Anti-receptor-mediated blocking of Ly49A/ligand interaction was equally efficient to restore NF-AT activation in all conditions as reflected by a constant inhibition index (Fig. 2B). Therefore, in the SEE concentration range tested and for the transfectants expressing low (JAX22) or high (JAX1) levels of Ly49A, we used conditions where Ly49A inhibition signal will not be masked by a too strong activation signal. We used 3.3 µg/ml of SEE in all experiments presented below.

To evaluate how the expression level of Ly49A influences TCR signaling, transfectants expressing different levels of Ly49A were compared for their capacity to be activated with SEE in the presence of H-2^d APCs. Blocking the Ly49A/ligand interaction with either anti-H-2D^d or anti-Ly49A mAbs increased NF-AT response in all transfectants

(Fig. 3A). It is important to note that in the absence of Ly49A/ligand interaction, all the clones gave a comparable response to SEE, demonstrating that all the selected clones react similarly. Remarkably, the Ly49A-mediated inhibition is proportional to the receptor expression level up to a certain level (MFI = 6.5, clone JAVJ) where increasing expression of Ly49A did not further inhibit significantly TCR-induced activation of NF-AT (Fig. 3C).

Engagement of Ly49A with H-2D^b fails to alter TCR-mediated activation

Even though soluble MHC class I tetramers binding studies identified H-2D^b as a ligand of Ly49A³³, all Ly49A transfectants gave responses similar in presence or absence of anti-H-2D^b or anti-receptor mAbs when H-2^b APCs were used (Fig. 3B and 3C). Therefore, even with clones expressing high levels of Ly49A, there was no evidence that engagement of Ly49A with H-2D^b provided inhibitory signal. However, it is possible that the sensitivity of our assay system did not allow the detection of weak inhibitory signal that would alter T cell responses only in conditions where TCR-mediated activation is very low.

Engagement of Ly49C with H-2K^b but not with H-2D^b alters SEE-induced TCR signaling

To determine whether Ly49-mediated inhibition of TCR-signaling as observed for Ly49A applies also to other Ly49 inhibitory receptors, we performed similar analysis with Jurkat clones expressing Ly49C. As shown in Fig. 4A, in the presence of optimal concentration of anti-Ly49C mAbs, a 2.4 fold enhancement of NF-AT activation was induced by SEE presented by H-2^b APCs. Consistent with previous observations in cell adhesion assays⁵⁰,

anti-Ly49C mAbs recognizing epitopes in the carbohydrate recognition domain (CRD) or in the stalk of the extracellular portion of the receptor were equally efficient in blocking Ly49C-mediated signaling (Fig. 4A). No additive effect was seen when the two mAbs were combined. Blocking Ly49C receptor or H-2K^b ligand resulted in a comparable restoration of NF-AT (Fig. 4B) suggesting that the interaction of Ly49C with H-2K^b alone inhibited T cell response of Ly49C transfectants to SEE-induced activation in the presence of H-2^b APCs. However, since binding of Ly49C transfectants to H-2D^b-transfected cells²⁶ and to soluble D^b tetramers^{17,33} has been reported, it was important to directly evaluate whether H-2D^b could be involved in triggering Ly49C-mediated inhibition of T cell activation. Adding anti-H-2D^b mAbs to cultures containing anti-H-2K^b mAbs did not lead to further enhancement of NF-AT activation (Fig. 4B). It is important to note that the B22-249 H-2D^b-specific mAb used in these experiments blocked D^b tetramer binding to Ly49C.¹⁷ No restoration of NF-AT activation was obtained when anti-H-2K^b was replaced by anti-H-2K^d isotype control in the mAb mixture containing anti-H-2D^b. Therefore, despite the capacity of Ly49C to bind H-2D^b, this interaction did not generate an inhibitory signal in T cell transfectants activated under our experimental conditions.

H-2^d molecules represent weaker Ly49C ligands than H-2^b

Since both H-2K^d and H-2D^d have been reported to interact with Ly49C²⁴ it was of interest to evaluate whether H-2^d class I molecules had the capacity to alter SEE-induced activation of Ly49C T cell transfectants. A Jurkat clone expressing Ly49A was used as a control to insure that level of expression of H-2^d class I molecules on the APCs was sufficient to generate a strong inhibitory signal. In the presence of H-2^d APCs, NF-AT responses were slightly but significantly enhanced in the presence of anti-Ly49C receptor

mAb (Fig. 5). These results demonstrate that interaction of Ly49C with MHC class I molecules of the H-2^d haplotype inhibits TCR-mediated activation of T cells. Since Ly49C/H-2^d interaction repeatedly inhibited less NF-AT activation than Ly49C/H-2^b interaction, in spite of comparable levels of MHC class I expression on H-2^d and H-2^b cells (data not shown), H-2^d molecules likely represent weaker Ly49C ligands than H-2K^b. We attempted to establish whether H-2K^d and H-2D^d molecules are equally involved in inhibiting NF-AT response of Ly49C transfectants to SEE-induced activation. Our results were not statistically significant due to the overall weak inhibition with H-2^d APCs (data not shown). Transfectants with higher Ly49C expression levels might be needed to address this issue.

Discussion

In this report, we analyzed the capacity of Ly49A and Ly49C to inhibit TCR-signaling upon interaction with H-2^b and H-2^d cells. Using anti-Ly49 or anti-H-2 class I blocking mAbs, we demonstrated that both receptors upon engagement with their ligands interfere with TCR-mediated activation of NF-AT and IL-2 production. Most importantly, we showed that the strength of functional inhibition correlates with the affinity and the expression level of Ly49 receptors.

In the context of interaction with H-2D^d, we found that the intensity of inhibition mediated by Ly49A engagement correlates with inhibitory receptor density up to a certain level of expression above which no increase in functional inhibition can be achieved. Inhibitory and activating signals are integrated to control cellular responses. In our experimental system, TCR-mediated positive signals stay constant. Therefore, our results directly demonstrate that increasing Ly49A expression quantitatively increased inhibitory effect on signaling. Since inhibition is dependent on signaling pathways downstream of Ly49 engagement, which include SHP-1 recruitment by Ly49, the maximum inhibition may be reached when one element important within this cascade becomes limiting. The maximum inhibitory effect is also likely modulated by T cell receptor density and affinity for MHC-peptide complexes as well as density of these complexes on APCs. In addition, depending on the affinity of the Ly49 receptor for its ligand and therefore of its capacity to initiate the inhibitory cascade, the number of Ly49 molecules required to reach the plateau level should be higher for a low affinity than for a high affinity ligand. In agreement with this hypothesis, we found that maximum inhibition was reached at relatively low receptor expression level for Ly49A that has high affinity for H-2D^d.⁵¹

We found that Ly49A/H-2^b interaction does not lead to an inhibitory signal even when Ly49A is expressed at high density on the cell surface. D^b tetramers have been reported to bind to Ly49A³³ but binding of Ly49A to H-2D^b expressed on cell is likely of low affinity, if at all, since functional and cellular adhesion assays have failed to demonstrate an interaction between Ly49A and H-2^b.^{17,22,24} In agreement with a lack of functional interaction of Ly49A with H-2^b class I molecules, perturbations in the TCR V α and V β repertoires seen in H-2^d Ly49A transgenic mice were not detected in the H-2^b Ly49A transgenic mice.⁹ However, the small but significant down-modulation of Ly49A expression level in H-2^b mice compared to β 2-microglobulin (β ₂m)-deficient mice in both the C57BL/6 (B6) and BALB/c backgrounds suggested that Ly49A might bind to H-2K^b or H-2D^b.⁵ Similarly, altered T cell repertoire selection¹⁸ and impaired virus-¹⁹ and tumor-specific⁵² T cell responses in Ly49A transgenic mice were also detected in H-2^b mice, thus suggesting that weak interaction of Ly49A with H-2K^b or H-2D^b molecules may produce inhibitory signals under particular circumstances. In our transfectants, the expression level of Ly49A in highest expressing clones might still be below the threshold required for functional inhibition upon interaction of Ly49A with H-2^b. However, since the cell surface expression level of Ly49A in our transfectants is within the physiological range of Ly49A expression found on freshly isolated splenic NK and T cells (Figure 6/Annexe C), this hypothesis is unlikely. It is also possible that the sensitivity of our assay system does not allow the detection of weak inhibitory signal that would alter T cell responses only in conditions where TCR-mediated activation is very low.

Ly49C recognizes a broad range of MHC class I molecules and binds most strongly to H-2K^b.^{17,24,26,33} In the range of expression tested, we did not find a significant difference in inhibitory signals upon interaction with H-2K^b in clones expressing different levels of Ly49C. At least two explanations could account for this finding. The fold variations in

our clones is not different enough to detect a significant difference in the intensity of the inhibitory signal or the expression of Ly49C in the lowest expressing clone is sufficient to reach the maximum inhibition delivered upon Ly49C/H-2K^b binding. Additional clones with higher and lower expression levels of Ly49C have to be generated to resolve this issue. Anti-receptor mAb specific for either the stalk or the CRD of the extracellular portion of the Ly49C receptor is sufficient to abrogate inhibitory signaling induced by Ly49C/H-2K^b interaction. This finding corroborates the effects observed with such mAbs in cell-cell adhesion assays⁵⁰ and emphasizes the critical importance of the epitope recognized by the stalk-specific 4LO3311 mAb for a functional interaction of Ly49C with H-2K^b.

Despite the reported binding of Ly49C to D^b tetramers^{17,33} and to RBL-1 cells transfected with H-2D^b²⁶, we found that functional inhibitory interactions of Ly49C with H-2^b class I molecules were only due to H-2K^b. Several studies are in agreement with these results. B22-249 anti-H-2D^b mAb was inefficient to alter the resistance of H-2^b Con A blasts to lysis by Ly49C/I⁺ LAK cells from (BALB/c X B6)F₁ mice.⁵³ Blocking mAb experiments revealed that Ly49C/H-2D^b interaction does not contribute to adhesion of COS cells expressing Ly49C to H-2^b IC-21 cell line.²⁴ Ly49C transfectants bound to B6 Con A blasts but not at all to those from H-2K^b-deficient mice.¹⁷ LAK cells from non-transgenic and Ly49C transgenic mice killed Con A blasts from H-2K^b-deficient mice with the same efficiency.¹² In our experimental system, we can directly compare semi-quantitatively the functional effect of binding of a given Ly49 receptor to individual MHC-class I molecules since there is no contribution of other inhibitory MHC-class I binding receptors. We can therefore conclude that, if Ly49C bind at all to H-2D^b, these molecules would certainly be weaker Ly49C ligands than H-2K^b molecules. As proposed above for Ly49A/H-2D^b interaction, increasing Ly49C expression and/or lowering TCR-mediated signaling might

help to demonstrate whether the Ly49C/H-2D^b interaction could generate a functional inhibition.

For the reasons discussed above, low anti-receptor mAb-mediated restoration of NF-AT activation and IL-2 production obtained using Ly49C transfectants stimulated with H-2^d APCs compared to H-2^b APCs likely reflects the lower affinity of Ly49C for H-2^d than for H-2^b ligands. Consistent with this result, the capacity of class I H-2^b ligands to down-modulate Ly49C receptor expression on NK and T cells is higher than that of H-2^d ligands.^{12,16,46,53}

Ly49 receptors have been shown to modulate T cell responses such as CD69 up-regulation whereas others such as cytotoxicity do not seem to be affected via naturally expressed Ly49 receptors²¹, in comparison to transgenically expressed Ly49 receptors^{13, 19}. Activation thresholds for elicitation of these various T cell responses are likely to be different and the strength of Ly49-mediated inhibition required to block these responses will vary accordingly. *In vivo*, up-regulation of Ly49 cell surface expression has been suggested to occur during or after T cell activation.²¹ We demonstrated that the capacity of Ly49 receptors to alter TCR-mediated signaling correlates with the ligand affinity and the receptor density. Considering that Ly49 receptor expression is subjected to modulation by H-2- and non-H-2-dependent factors, the consequences for the functional outcome of activated T cells may be determinant depending on the Ly49 receptor ligands available on APCs.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada. We thank Drs. F. Takei for providing Ly49A and Ly49C cDNAs, J. P. Allison and U. Hämmerling for providing A1 and B22-249 mAbs, respectively.

References

- 1 Takei F, Brennan J Mager DL. The Ly-49 family: genes, proteins and recognition of class I MHC. *Immunol Rev* 1997; **155**:67-77.
- 2 Burshtyn DN, Yang W, Yi T Long EO, A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP- 1. *J Biol Chem* 1997; **272**:13066-72.
- 3 Kane KP, Silver ET Hazes B, Specificity and function of activating Ly-49 receptors. *Immunol Rev* 2001; **181**:104-14.
- 4 Brennan J, Mager D, Jefferies W Takei F, Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties. *J Exp Med* 1994; **180**:2287-95.
- 5 Held W, Dorfman JR, Wu MF Raulet DH, Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur J Immunol* 1996; **26**:2286-92.
- 6 Kubota A, Kubota S, Lohwasser S, Mager DL Takei F, Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice. *J Immunol* 1999; **163**:212-6.
- 7 Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ Baxter AG, NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000; **21**:573-83.
- 8 McMahon CW Raulet DH, Expression and function of NK cell receptors in CD8(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 2001; **13**:465-70.
- 9 MacDonald HR, Lees RK Held W, Developmentally regulated extinction of Ly-49 receptor expression permits maturation and selection of NK1.1+ T cells. *J Exp Med* 1998; **187**:2109-14.

- 10 Fahlen L, Khoo NK, Daws MR, Sentman CL, Location-specific regulation of transgenic Ly49A receptors by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur J Immunol* 1997; **27**:2057-65.
- 11 Pauza M, Smith KM, Neal H, Reilly C, Lanier LL, Lo D, Transgenic expression of Ly-49A in thymocytes alters repertoire selection. *J Immunol* 2000; **164**:884-92.
- 12 Fahlen L, Lendahl U, Sentman CL, MHC class I-Ly49 interactions shape the Ly49 repertoire on murine NK cells. *J Immunol* 2001; **166**:6585-92.
- 13 Fahlen L, Oberg L, Brannstrom T, Khoo NK, Lendahl U, Sentman CL, Ly49A expression on T cells alters T cell selection. *Int Immunol* 2000; **12**:215-22.
- 14 Hanke T, Raulet DH, Cumulative inhibition of NK cells and T cells resulting from engagement of multiple inhibitory Ly49 receptors. *J Immunol* 2001; **166**:3002-7.
- 15 Skold M, Cardell S, Differential regulation of Ly49 expression on CD4+ and CD4-CD8- (double negative) NK1.1+ T cells. *Eur J Immunol* 2000; **30**:2488-96.
- 16 Held W, Cado D, Raulet DH, Transgenic expression of the Ly49A natural killer cell receptor confers class I major histocompatibility complex (MHC)-specific inhibition and prevents bone marrow allograft rejection. *J Exp Med* 1996; **184**:2037-41.
- 17 Hanke T, Takizawa H, McMahon CW *et al*, Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity* 1999; **11**:67-77.
- 18 Oberg L, Eriksson M, Fahlen L, Sentman CL, Expression of Ly49A on T cells alters the threshold for T cell responses. *Eur J Immunol* 2000; **30**:2849-56.
- 19 Zajac AJ, Vance RE, Held W, Sourdive DJ, Altman JD, Raulet DH, Ahmed R, Impaired anti-viral T cell responses due to expression of the Ly49A inhibitory receptor. *J Immunol* 1999; **163**:5526-34.
- 20 Roger J, Chalifour A, Lemieux S, Duplay P, Cutting edge: Ly49A inhibits TCR/CD3-induced apoptosis and IL-2 secretion. *J Immunol* 2001; **167**:6-10.

- 21 Coles MC, McMahon CW, Takizawa H, Raulet DH, Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors. *Eur J Immunol* 2000; **30**:236-44.
- 22 Karlhofer FM, Ribaldo RK, Yokoyama WM, MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 1992; **358**:66-70.
- 23 Mason LH, Ortaldo JR, Young HA, Kumar V, Bennett M, Anderson SK, Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1: a member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). *J Exp Med* 1995; **182**:293-303.
- 24 Brennan J, Mahon G, Mager DL, Jefferies WA, Takei F, Recognition of class I major histocompatibility complex molecules by Ly-49: specificities and domain interactions. *J Exp Med* 1996; **183**:1553-9.
- 25 Johansson MH, Hoglund E, Nakamura MC, Ryan JC, Hoglund P, Alpha1/alpha2 domains of H-2D(d), but not H-2L(d), induce "missing self" reactivity *in vivo*--no effect of H-2L(d) on protection against NK cells expressing the inhibitory receptor Ly49G2. *Eur J Immunol* 1998; **28**:4198-206.
- 26 Lian RH, Li Y, Kubota S, Mager DL, Takei F, Recognition of class I MHC by NK receptor Ly-49C: identification of critical residues. *J Immunol* 1999; **162**:7271-6.
- 27 Nakamura MC, Linnemeyer PA, Niemi EC, Mason LH, Ortaldo JR, Ryan JC, Seaman WE, Mouse Ly-49D recognizes H-2Dd and activates natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* 1999; **189**:493-500.
- 28 Olsson-Alheim MY, Sundback J, Karre K, Sentman CL, The MHC class I molecule H-2Dp inhibits murine NK cells via the inhibitory receptor Ly49A. *J Immunol* 1999; **162**:7010-4.
- 29 George TC, Mason LH, Ortaldo JR, Kumar V, Bennett M, Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells. *J Immunol* 1999; **162**:2035-43.

- 30 Silver ET, Gong DE, Chang CS, Amrani A, Santamaria P Kane KP, Ly-49P activates NK-mediated lysis by recognizing H-2Dd. *J Immunol* 2000; **165**:1771-81.
- 31 Silver ET, Gong D, Hazes B Kane KP, Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H-2D(k) and H-2D(d). *J Immunol* 2001; **166**:2333-41.
- 32 Kane KP, Ly-49 mediates EL4 lymphoma adhesion to isolated class I major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* 1994; **179**:1011-5.
- 33 Michaelsson J, Achour A, Salcedo M, Kase-Sjostrom A, Sundback J, Harris RA Karre K. Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity with soluble major histocompatibility complex class I tetramers. *Eur J Immunol* 2000; **30**:300-7.
- 34 Makrigiannis AP, Pau AT, Saleh A, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR Anderson SK, Class I MHC-binding characteristics of the 129/J Ly49 repertoire. *J Immunol* 2001; **166**:5034-43.
- 35 Raulet DH, Vance RE McMahon CW, Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**:291-330.
- 36 Nakamura MC, Niemi EC, Fisher MJ, Shultz LD, Seaman WE Ryan JC, Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in natural killer cell cytotoxicity and functionally associates with the SHP-1 tyrosine phosphatase. *J Exp Med* 1997; **185**:673-84.
- 37 Olsson MY, Karre K Sentman CL, 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* 1995; **92**:1649-53.
- 38 Olsson-Alheim MY, Salcedo M, Ljunggren HG, Karre K Sentman CL, NK cell receptor calibration: effects of MHC class I induction on killing by Ly49A^{high} and Ly49A^{low} NK cells. *J Immunol* 1997; **159**:3189-94.
- 39 Long EO, Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**:875-904.

- 40 Roth C, Kourilsky P Ojcius DM, Ly-49-independent inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by a soluble major histocompatibility complex class I molecule. *Eur J Immunol* 1994; **24**:2110-4.
- 41 Evans GA, Margulies DH, Shykind B, Seidman JG Ozato K. Exon shuffling: mapping polymorphic determinants on hybrid mouse transplantation antigens. *Nature* 1982; **300**:755-7.
- 42 Kuhns ST Pease LR, A region of conformational variability outside the peptide-binding site of a class I MHC molecule. *J Immunol* 1998; **161**:6745-50.
- 43 Nagasawa R, Gross J, Kanagawa O, Townsend K, Lanier LL, Chiller J Allison JP, Identification of a novel T cell surface disulfide-bonded dimer distinct from the alpha/beta antigen receptor. *J Immunol* 1987; **138**:815-24.
- 44 Allen H, Wraith D, Pala P, Askonas B Flavell RA, Domain interactions of H-2 class I antigens alter cytotoxic T-cell recognition sites. *Nature* 1984; **309**:279-81.
- 45 Lemieux S, Ouellet-Talbot F, Lusignan Y, Morelli L, Labreche N, Gosselin P Lecomte J, Identification of murine natural killer cell subsets with monoclonal antibodies derived from 129 anti-C57BL/6 immune spleen cells. *Cell Immunol* 1991; **134**:191-204.
- 46 Gosselin P, Lusignan Y, Brennan J, Takei F Lemieux S, The NK2.1 receptor is encoded by Ly-49C and its expression is regulated by MHC class I alleles. *Int Immunol* 1997; **9**:533-40.
- 47 Depatie C, Chalifour A, Pare C, Lee SH, Vidal SM Lemieux S, Assessment of Cmv1 candidates by genetic mapping and *in vivo* antibody depletion of NK cell subsets. *Int Immunol* 1999; **11**:1541-51.
- 48 Duplay P, Alcover A, Fargeas C, Sekaly RP Branton PE, An activated epidermal growth factor receptor/Lck chimera restores early T cell receptor-mediated calcium response in a CD45-deficient T cell line. *J Biol Chem* 1996; **271**:17896-902.

- 49 Nemorin JG, Laporte P, Berube G Duplay P, p62(dok) Negatively regulates cd2 signaling in jurkat cells. *J Immunol* 2001; **166**:4408-15.
- 50 Brennan J, Lemieux S, Freeman JD, Mager DL Takei F, Heterogeneity among Ly-49C natural killer (NK) cells: characterization of highly related receptors with differing functions and expression patterns. *J Exp Med* 1996; **184**:2085-90.
- 51 Chang CS, Shen L, Gong DE Kane KP, Major histocompatibility complex class I-dependent cell binding to isolated Ly-49A: evidence for high-avidity interaction. *Eur J Immunol* 1996; **26**:3219-23.
- 52 Brawand P, Lemonnier FA, MacDonald HR, Cerottini JC Held W, Transgenic expression of Ly49A on T cells impairs a specific antitumor response. *J Immunol* 2000; **165**:1871-6.
- 53 Yu YY, George T, Dorfman JR, Roland J, Kumar V Bennett M, The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts. *Immunity* 1996; **4**:67-76.

Abbreviations: B6: C57BL/6 β 2m: β 2-microglobulin CRD: carbohydrate recognition domain MFI: mean fluorescence intensity NKT: CD1d-restricted T cells expressing the NK cell marker NK1.1 RLU: relative light unit SEE: Staphylococcal enterotoxin E WT: wild type.

*Figure Legends***Fig. 1. Interaction of Ly49A with H-2D^d inhibits SEE-induced NFAT activation and IL-2 production.**

(A) Parental Jurkat cells (JWT) or Ly49A-expressing clone (JAX1) were transiently transfected with NF-AT-luciferase reporter plasmid and stimulated with SEE at 3.3 $\mu\text{g/ml}$ and APCs from BALB/c (H-2^d) mice in the absence (-) or presence of anti-Ly49A (A1) or anti-H-2D^d $\alpha 1/\alpha 2$ domain-specific mAbs used at the indicated concentrations. NF-AT-firefly luciferase values were normalized on the constitutive Renilla luciferase activity and expressed as Relative Light Units (RLU). Numbers indicated on top of columns correspond to mean inhibition indexes \pm SD and were determined as SEE-induced response obtained in presence of the anti-Ly49 receptor or anti-H-2 class I mAbs divided by response obtained in absence of mAbs.

(B) Cells were stimulated as in (A). Antibodies of each specificity were added at 20 $\mu\text{g/ml}$ final concentration. The domain specificity of anti-ligand mAbs is indicated. Inhibition indexes were calculated as indicated in (A).

(C) Cells were stimulated as in (A). After 24 h, supernatant samples were collected and assayed for IL-2. The anti-H-2D^d mAbs used is $\alpha 1/\alpha 2$ domain-specific. Inhibition indexes were calculated as indicated in (A).

Fig. 2. Relationship between Ly49A- and TCR-mediated signaling.

(A) Parental Jurkat cells (JWT) and (B) Ly49A-transfected cells (JAX22 and JAX1 expressing low and high receptor levels, respectively) were transiently transfected with NF-AT-luciferase reporter plasmid and stimulated with H-2^d APCs and increasing concentration of SEE in presence or absence of Ly49A specific mAb (anti-R). Luciferase

activity were determined in each condition and used to calculate inhibition indexes obtained at the different SEE concentrations indicated.

Fig. 3. Ly49A-mediated inhibition of TCR-induced activation varies with the expression level of the receptor.

Parental Jurkat cells (JWT) and Ly49A-transfectants (as indicated) were transiently transfected with NF-AT-luciferase reporter plasmid and stimulated with BALB/c, H-2^d (A) or B6, H-2^b (B) APCs in the absence (open triangles) or presence of anti-Ly49A (filled symbols), anti-H-2D^d (open circles) or anti-H-2D^b (open squares) mAbs. Normalized luciferase activity obtained for each cell line in each condition is read on the left scale. Symbols corresponding to each experimental condition tested are connected by a line only for clarity of presentation. Transfectants are ranked by increasing expression levels of Ly49A (open columns) determined as mean fluorescence intensity (MFI read on the right scale) of Ly49A staining. The correlation between inhibition indexes (calculated as described in Fig. 1A) and Ly49A expression levels is illustrated (C).

Fig. 4. Ly49C/H-2K^b interaction inhibits SEE-induced NF-AT activation.

(A) Jurkat cells expressing Ly49C (JCV71) were transiently transfected with NF-AT-luciferase reporter plasmid and stimulated with APCs from B6 (H-2^b) mice in absence (-) or presence of anti-Ly49C stalk-specific (4LO3311) and/or CRD-specific (5GA5) mAbs as indicated.

(B) Jurkat transfectants expressing Ly49C (JCX2, JCV13 and JCV71) were transiently transfected with NF-AT-luciferase reporter plasmid and stimulated with H-2^b APCs in absence or presence of blocking mAbs as indicated. Numbers indicated on top of columns correspond to inhibition indexes determined with anti-Ly49C (5GA5) mAbs and

calculated as described in Fig. 1A. All the mAbs used have no significant effect on SEE-induced NF-AT activation of the parental Jurkat cell line (data not shown).

Fig. 5. Effect of Ly49C/H-2^d interaction on SEE-induced NF-AT activation.

Parental Jurkat cells (JWT), Ly49A transfectant (JAVJ) and Ly49C transfectants (JCV13 and JCV71) were transiently transfected with NF-AT-luciferase reporter plasmid and stimulated with H-2^d APCs in absence or presence of anti-Ly49A (A1) or anti-Ly49C (5GA5) mAbs. Inhibition indexes shown on top of columns were calculated as indicated in Fig. 1A.

Table 1 Expression of Ly49A and Ly49C receptors on Jurkat T cells transfectants

Jurkat/Ly49A ⁺ clones		Jurkat/Ly49C ⁺ clones	
JAX22	3.0 ^{a)}	JCV13	5.6
JAX9	4.0	JCX2	7.6
JAVJ	6.5	JCV71	11.1
JAV14	10.4		
JAV17	29.4		
JAX1	35.0		

a) Mean fluorescence intensity of Ly49 receptor at the cell surface of transfected cells stained with A1 (anti-Ly49A) and 4LO3311 (anti-Ly49C) mAbs plus FITC-conjugated anti-mouse IgG.

Figure 1

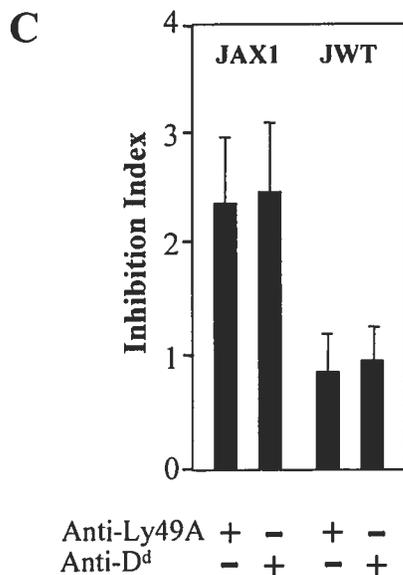
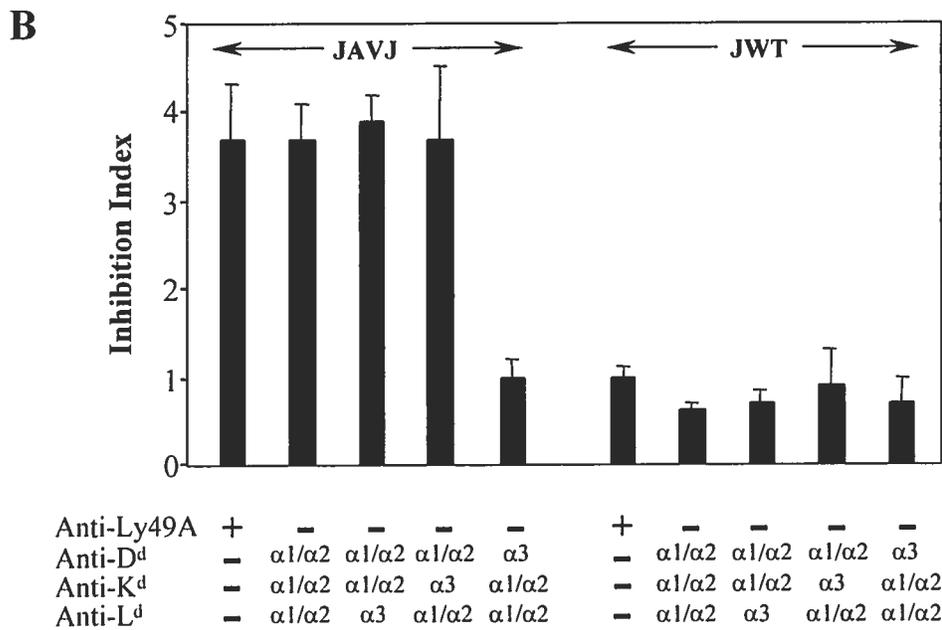
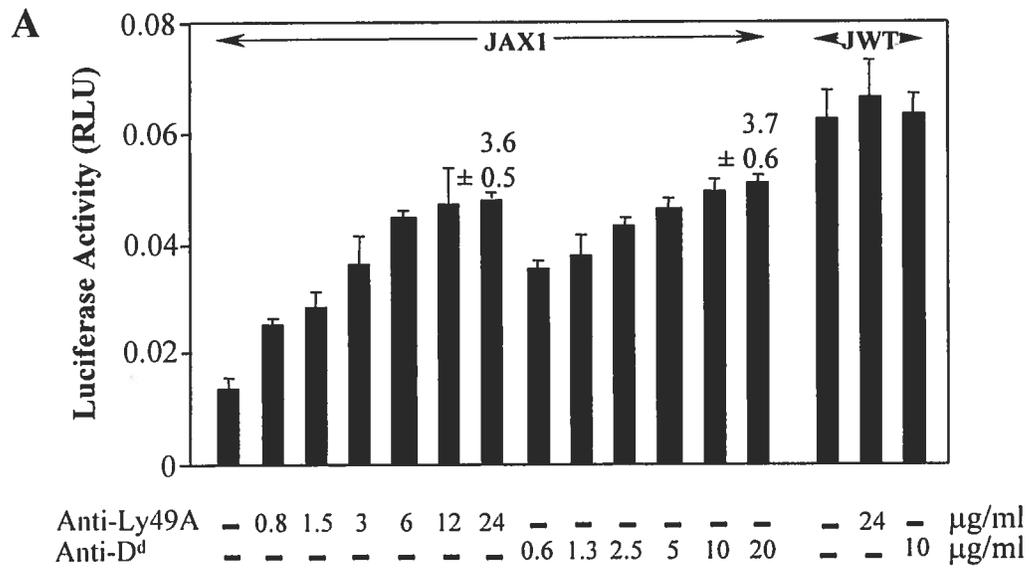


Figure 2

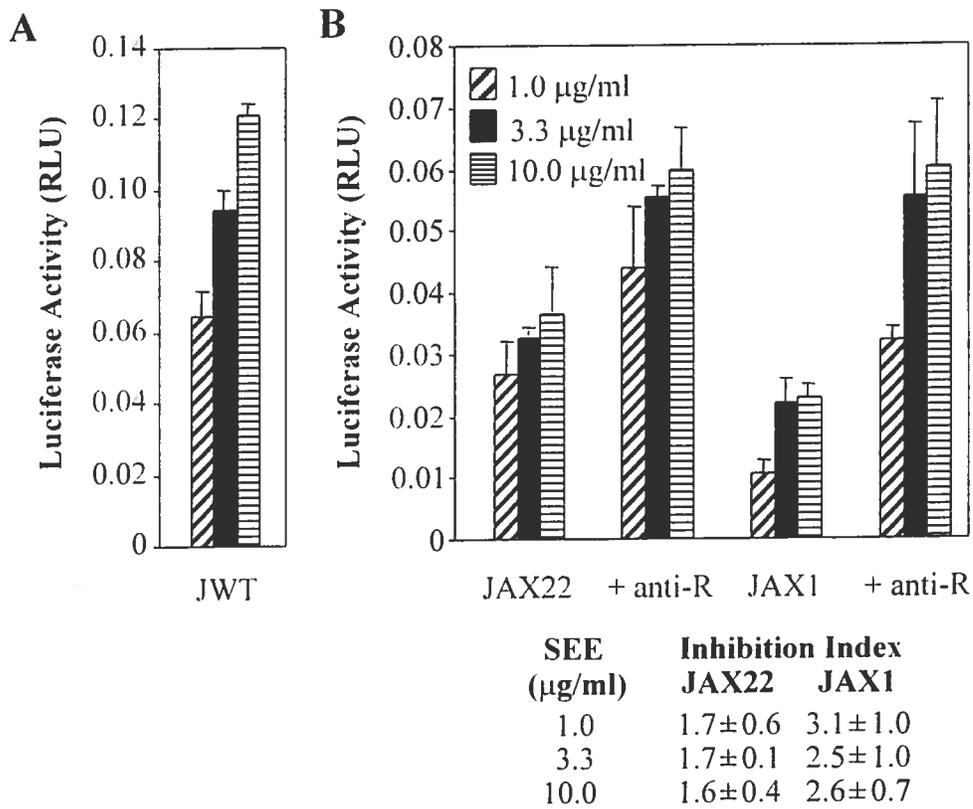


Figure 3

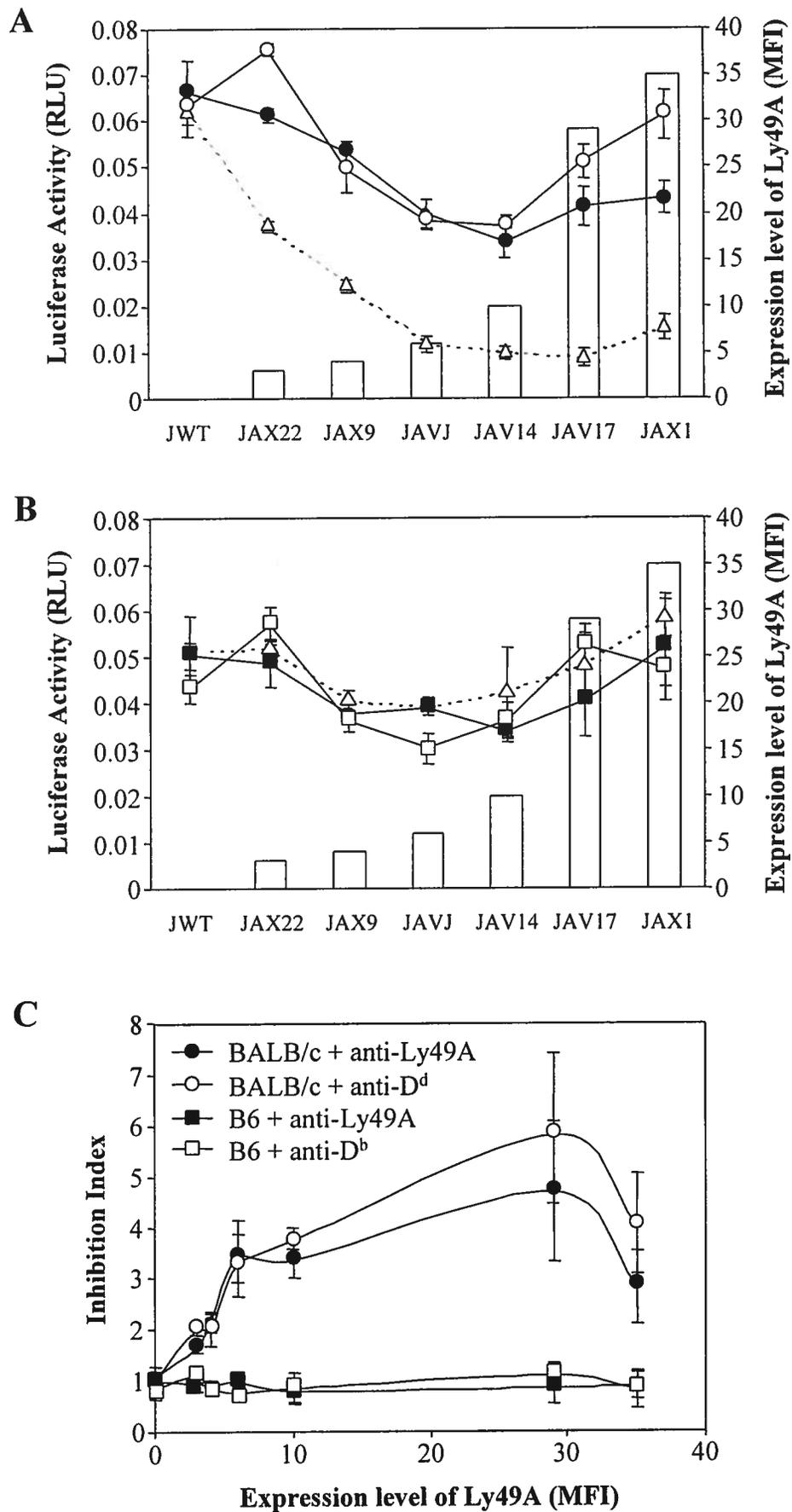


Figure 4

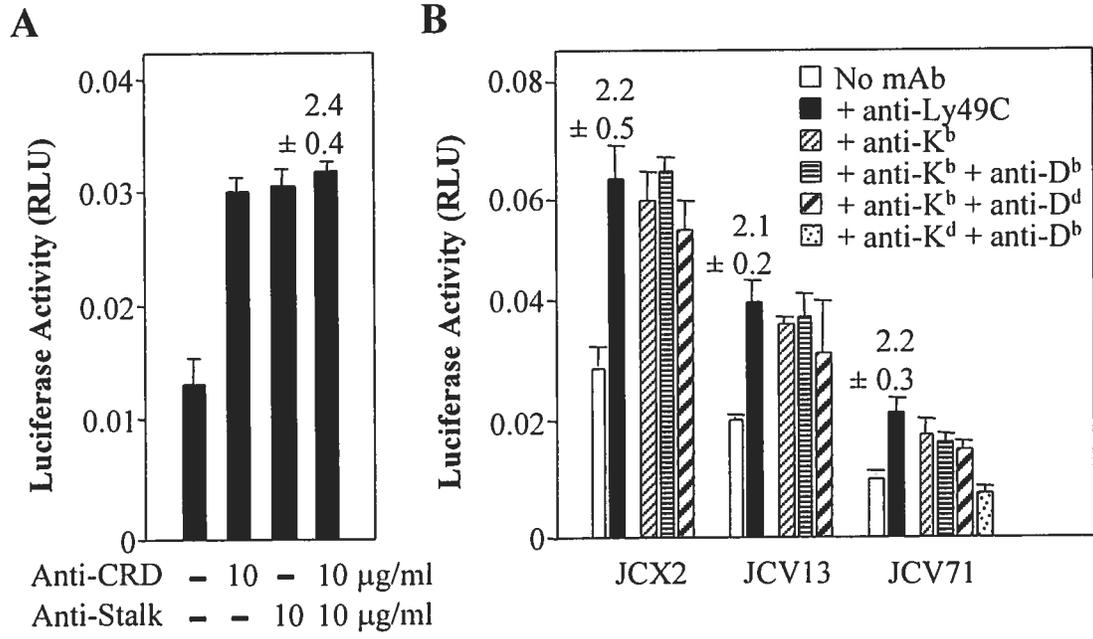
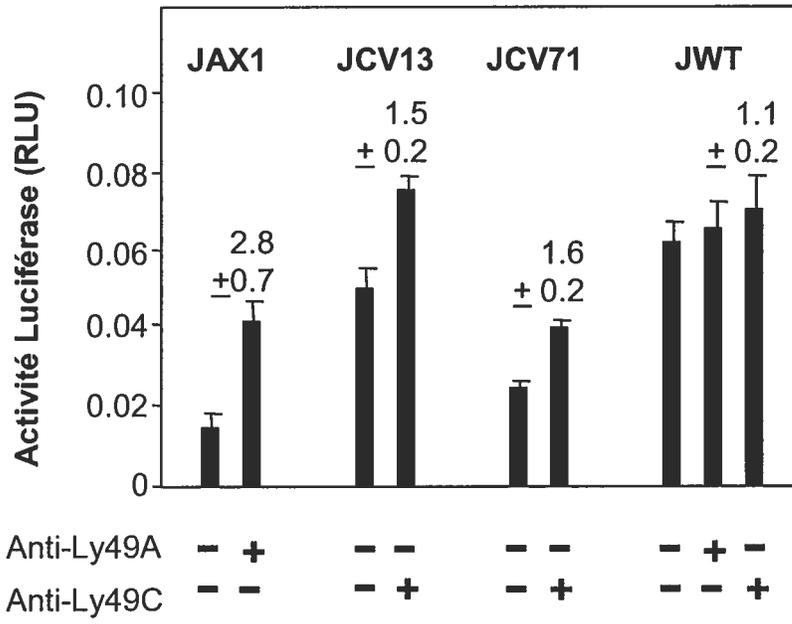


Figure 5



Chapitre 4 :

Article III : Ly49A inhibits TCR/CD3-induced apoptosis and IL-2 secretion.

MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE III

La mort cellulaire programmée dite apoptose, est un mécanisme important qui assure la tolérance au soi et l'homéostasie du système immunitaire. Elle peut être enclenchée par négligence ("death by neglect"), par exemple lorsque les récepteurs spécifiques d'antigènes ne sont pas stimulés ou lorsque des cellules se retrouvent dans un environnement pauvre en cytokines. La mort cellulaire peut aussi être initiée suite à l'interaction entre un récepteur de mort et son ligand, telle l'interaction Fas/FasL (revu par Krammer, 2000). Plusieurs membres de la famille du TNF sont des récepteurs transmembranaires qui comportent dans leur queue cytoplasmique un "domaine de mort". Ce domaine est essentiel à la transduction du signal apoptotique faisant suite à la reconnaissance de leur ligand puisqu'il permet le recrutement de protéines adaptatrices qui initie une cascade impliquant toute une série de protéases et de DNases. Cette cascade conduit notamment à la perte de l'asymétrie membranaire et à la fragmentation de l'ADN, caractéristiques des cellules apoptotiques (revu par Janssen *et al.*, 2000).

Chez les cellules T matures, la délétion par apoptose est d'une importance capitale pour réduire la population de lymphocytes activés par un antigène, lorsque ce dernier a été éliminé. Ce mécanisme nommé AICD permet de mettre fin à la réponse immune de façon à ce qu'elle ne puisse pas devenir dommageable pour l'hôte. L'interaction Fas/FasL est le plus souvent impliquée dans l'initiation de l'AICD, mais elle est aussi impliquée dans la destruction de cellules cibles par les cellules cytotoxiques T et NK (immunité antitumorale et antivirale) par voie indépendante du calcium et de la perforine (revu par Kramer, 2000). L'importance de l'interaction Fas/FasL est démontrée par les altérations pathologiques profondes observées chez les patients et les animaux montrant un défaut génétique de Fas ou FasL (revu par Siegel *et al.*, 2000).

Donc, tel que mentionné précédemment, la majorité des lymphocytes T seront éliminés par apoptose suite à une réponse antigénique. Toutefois, une certaine portion de ces cellules survit et devient des cellules mémoires. Plusieurs molécules semblent jouer un

rôle dans la survie des lymphocytes T activés telles des cytokines, des récepteurs de co-stimulation, des molécules de signalisation, etc. (revu par Janssen *et al.*, 2000). Or, des NKR spécifiques des molécules du CMH-I sont exprimés à la surface de 5 à 10% des lymphocytes T retrouvés en périphérie, 77% de ces lymphocytes T NKR⁺ sont CD8⁺, 7% sont CD4⁺ et, chez les souches de souris qui expriment cette molécule, environ 30% sont NK1.1⁺ (Mingari *et al.*, 1996; Mingari *et al.*, 1997; Ortaldo *et al.*, 1998; Andre *et al.*, 1999; Speiser *et al.*, 1999b). Étonnamment les NKR ne semblent pas être exprimés à la surface de lymphocytes T CD8⁺ thymiques ou naïfs, mais plutôt de lymphocytes T CD8⁺ mémoires (Mingari *et al.*, 1996). Quelques équipes avaient même identifié ces récepteurs à la surface de lymphocytes T CD8⁺ isolés chez l'homme et la souris qui étaient spécifiques d'antigènes tumoraux, viraux et autologues (Ikeda *et al.*, 1997; Noppen *et al.*, 1998; Speiser *et al.*, 1999b). Puisque le TCR de ces cellules était plutôt de nature oligoclonale, on a soulevé l'hypothèse que l'expression des NKR à la surface de ces cellules pourrait être le fruit d'une expansion clonale subséquente à une stimulation antigénique chronique (Borthwick *et al.*, 1996; Mingari *et al.*, 1996). On a d'ailleurs observé que la stimulation de cellules T, notamment lors d'une infection virale ou par certaines cytokines, pouvait induire l'expression des NKR à leur surface (Blaser *et al.*, 1998; Ikarashi *et al.*, 1998; Mingari *et al.*, 1998b; Bertone *et al.*, 1999). Il avait alors été proposé que l'expression et l'engagement fonctionnel des NKR inhibiteurs puissent procurer aux cellules T activées, un mécanisme assurant qu'elles ne soient pas hyper-stimulées, ce qui provoquerait soit leur épuisement fonctionnel, soit le développement d'une réaction auto-immune ou soit leur mort (AICD) (Mingari *et al.*, 1998a).

Au moment où nous avons entrepris nos travaux, les résultats obtenus de clones de cellules T démontraient que les NKR inhibiteurs pouvaient effectivement interférer avec certaines de leurs fonctions telles la prolifération (Held *et al.*, 1996a; Hanke *et al.*, 1999), la synthèse de cytokines (Ortaldo *et al.*, 1998) et l'activité cytotoxique (Mingari *et al.*, 1998a; Ortaldo *et al.*, 1998; Zajac *et al.*, 1999). Aussi, la production de souris transgéniques pour le récepteur Ly49A exprimé à la surface des lymphocytes T et chez qui le ligand de Ly49A est présent, avait permis d'observer une chute significative de

leurs réponses allogéniques (Held *et al.*, 1996a) et antivirales (Zajac *et al.*, 1999), ainsi qu'une hausse du nombre de cellules T CD8⁺Ly49⁺ mémoires (Fahlen *et al.*, 1997; MacDonald *et al.*, 1998a). Cette dernière observation suggère que l'expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs à la surface des cellules T activées pourrait ainsi favoriser le développement de cellules T mémoires. Nous avons donc émis l'hypothèse que la reconnaissance de molécules du CMH-I par les récepteurs Ly49 inhibiteurs pourrait contrôler l'AICD des lymphocytes T. Ceci permettrait un taux de survie plus grand des cellules T Ly49⁺ suite à leur stimulation antigénique et par conséquent, expliquerait l'augmentation de la population de cellules T Ly49⁺ mémoires.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tiré profit d'un modèle d'étude simple, soit une lignée cellulaire dont la stimulation du complexe TCR/CD3 enclenche l'AICD. Cette lignée est un hybridome T CD4⁺ nommé 1F2 qui est spécifique d'un épitope de la β -galactosidase (450-462) présenté par la molécule I-E^P (Daniel *et al.*, 1998). Une série de clones ont été générés en transfectant ces cellules à l'aide du gène codant la molécule Ly49A ou la chimère Ly49A/H utilisée comme témoin. Dans cette chimère, la portion cytoplasmique du récepteur Ly49A a été remplacée par celle de Ly49H. Ly49H est un récepteur activateur dont la portion cytoplasmique est dépourvue d'ITIM.

Les objectifs que nous nous sommes fixés pour vérifier l'hypothèse émise étaient de : i) démontrer que le récepteur Ly49A exprimé à la surface de lymphocytes T est capable d'inhiber l'AICD engendrée par la stimulation du TCR et ce, que Ly49A soit engagé par des AcMo ou ii) par ses ligands naturels et iii) amorcer la caractérisation du ou des mécanismes responsables de cette inhibition.

ARTICLE III :
LY49A INHIBITS TCR/CD3-INDUCED APOPTOSIS AND IL-2 SECRETION

Joanne Roger, Anick Chalifour, Suzanne Lemieux et Pascale Duplay.

Centre de Recherche en Santé Humaine, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

Afin d'évaluer l'importance fonctionnelle du récepteur Ly49A dans différents événements cellulaires induits suite à la stimulation du TCR, nous avons établi des clones d'un hybridome de cellule T (1F2) exprimant Ly49A ou une version chimérique Ly49A/H dans laquelle la portion cytoplasmique de Ly49A a été remplacée par celle de Ly49H. L'engagement de Ly49A par son ligand H-2D^d ou à l'aide d'anticorps anti-Ly49A, entraîne l'inhibition de la sécrétion d'IL-2 induite via le complexe TCR/CD3. L'analyse du contenu en ADN diploïde et de la fixation de l'annexine V par analyse de cytométrie en flux, nous a permis de démontrer que l'engagement du récepteur Ly49A protège les cellules contre l'apoptose induite via le complexe TCR/CD3, qu'il soit effectué à l'aide d'anticorps ou d'antigènes. En contrepartie, l'engagement de la chimère Ly49A/H n'a aucun effet anti-apoptotique. De plus, l'engagement de Ly49A inhibe de façon sélective la transcription de FasL, qui est normalement induite par la stimulation du TCR, sans toutefois affecter celle de Fas. L'expression de récepteurs Ly49 sur les lymphocytes T peut donc représenter un mécanisme important de régulation de la survie des lymphocytes T *in vivo* en inhibant l'apoptose et la synthèse d'IL-2 induites lorsque le TCR est stimulé.

Article publié dans : *The Journal of Immunology* (2001), **167**: 6-10.

Cutting Edge: Ly49A Inhibits TCR/CD3-Induced Apoptosis and IL-2 Secretion¹

Joanne Roger, Anick Chalifour, Suzanne Lemieux, and Pascale Duplay²

To evaluate the importance of Ly49A on TCR-induced cellular events, we established clones of the 1F2 T cell hybridoma expressing either Ly49A or a chimeric version, Ly49A/H, where the Ly49A cytoplasmic domain has been replaced by the Ly49H cytoplasmic domain. Ligation of Ly49A, but not Ly49A/H, with its ligand H-2D^d or anti-Ly49A mAbs caused a specific inhibition of TCR/CD3-induced IL-2 secretion. Moreover, flow cytometry analysis of hypodiploid DNA and annexin V binding revealed that ligation of Ly49A protected cells from apoptosis induced by anti-CD3 mAbs or Ag. In contrast, ligation of the Ly49A/H chimeric receptor had no antiapoptotic effect. In addition, engagement of Ly49A selectively inhibited TCR-induced Fas ligand expression whereas TCR-induced Fas expression was not significantly affected. Expression of Ly49 inhibitory receptors on T cells may represent an important mechanism for the regulation of T cell survival *in vivo* by inhibiting TCR-induced apoptosis and IL-2 secretion. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 6–10.

Ly49 family of receptors are C-type lectin-like molecules which bind to specific MHC class I molecules (1). They include members with inhibitory and activating function (2). The expression of activating Ly49 receptors is restricted to NK cells, whereas inhibitory Ly49 receptors are expressed on NK cells and on a small subset of T cells (3, 4). T cells expressing Ly49 correspond to the CD1-restricted NK1.1⁺ T cells (5) and to non-CD1-restricted conventional T cells which are predominantly CD8⁺ T cells bearing surface markers of memory phenotype (6).

Several lines of evidence suggest that Ly49 receptors may regulate TCR signaling. Transgenic expression of Ly49A down-modulates the proliferation of T cells to allogenic stimulation (7) and impairs antiviral (8) and antitumor (9) T cell responses. Moreover, binding of Ly49A to its MHC class I ligand alters the threshold sensitivity for TCR-mediated activation (10), reduces the spontaneous IL-2 secretion in EL-4 cells (4), and inhibits CD3-induced up-regulation of CD69 in Ly49A⁺CD8⁺ T lymphocytes (6). Ex-

pression of another member of Ly49 inhibitory receptors, Ly49G2, on lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8⁺ T cells impairs their capacity to lyse targets that express a Ly49G2 ligand, H-2D^d (11).

In addition, using Ly49A-transgenic mice that coexpress an MHC class I ligand for Ly49A, it was demonstrated that expression of Ly49A on T cells promotes the survival of potentially self-reactive T cells by affecting both positive and negative selection of thymocytes (10, 12).

The experiments presented in this report were designed to further our understanding of the involvement of Ly49 in the regulation of T cell responses. In particular, we examined the role of Ly49A in the modulation of activation-induced cell death (AICD).³ We used a T cell hybridoma where TCR triggering by anti-CD3 mAbs or Ag induces AICD. Using this experimental model, we showed that engagement of Ly49A inhibits both CD3-induced IL-2 secretion and apoptosis.

Materials and Methods

Cell lines and Abs

1F2 is a T cell hybridoma specific for the I-E^b-restricted β -galactosidase (450–462) epitope (13). The C11-27-I-E^b is a B10.A-derived B cell lymphoma (H-2K^k, I-2D^d) that expresses the I-E^b class II molecule (14) and was used as APC.

mAbs used included anti-mouse CD3 ϵ , 145-2C11 (hamster Ig; American Type Culture Collection, Manassas, VA), anti-mouse Ly49A, A1 (mouse IgG2a, provided by J. Allison, University of California, Berkeley, CA), anti-I-2D^d, 34-5-8S (mouse IgG2a; American Type Culture Collection), anti-I-2K^k, 16-3-22S (mouse IgG2a; American Type Culture Collection), anti-I-E, 14-4-4S (provided by C. Daniel, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada), and anti-Fas (Jo2; BD PharMingen, San Diego, CA).

Plasmids and transfections

The plasmid pSR α -Ly49A was generated by cloning a *SacI*-*Bam*HI fragment corresponding to the Ly49A cDNA (pBSLy49A, kindly provided by F. Takei, University of British Columbia, Vancouver, Canada) into the plasmid pSR α puromycin.

The Ly49A/H construct was generated by PCR by overlap extension using the following primers and templates. Sense, 5'-CGGAATTGCGCCACCATGAGTGAGCAGGAGG-3' and antisense, 5'-CCAAGAGCTATCA CAATGA-3' primers were used to amplify the cytoplasmic domain of Ly49H with Ly49H cDNA as a template (kindly provided by F. Takei, University of British Columbia). Sense, 5'-TCATTGTGATAGCTCTTGG-3' and antisense, 5'-CGCTCGAGGATCTCAATGAGGGAATTTATC-3' primers were used to amplify the extracellular and transmembrane domains of Ly49A. The PCR product was subcloned into the *Eco*RI and *Bam*HI sites of pSR α puromycin. The nucleotide sequence of the chimeric construct was entirely verified.

Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada

Received for publication March 26, 2001. Accepted for publication May 3, 2001.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Pascale Duplay, Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada. E-mail address: pascale.duplay@inrs-iaf.quebec.ca

³ Abbreviations used in this paper: AICD, activation induced cell death; FasL, Fas ligand; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; 7-AAD, 7-amino-actinomycin D.

IF2 cells were transfected with 20 μg of either pSR α -Ly49A or pSR α -Ly49A/H and expression levels of Ly49A were evaluated by flow cytometry analysis as described previously (15).

Detection of apoptosis

Cells (4×10^5) were left unstimulated or stimulated with plate-bound anti-CD3 mAbs in the presence of anti-Ly49A mAbs or IgG2a isotype control mAbs. mAbs were coated on plastic at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS at 4°C overnight. After 15 h, cells were harvested and fixed in 70% ethanol at 0–4°C for at least 2 h. For analysis, cells were washed in HBSS. Cells were resuspended in 1 ml of IIBSS and 200 μl of DNA extraction buffer (0.2 M phosphate citrate buffer, pH 7.8) was added for 5 min. This last step was omitted for glucocorticoid-induced apoptosis. Finally, cells were centrifuged and resuspended in 1 ml of IIBSS containing 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide and 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase-free RNase.

Alternatively, the percentage of cells undergoing apoptosis was determined by staining 2×10^5 cells with annexin V-PE plus 7-amino-actinomycin D (7-AAD) and FACS analysis according to the manufacturer's instructions (BD PharMingen). For experiments with peptide stimulation, APCs were stained with biotinylated anti-I-E mAbs followed by streptavidin-FITC (BD PharMingen).

IL-2 assays

T cells (1×10^5) were stimulated in 96-well plates with serial dilutions of β -galactosidase (450–462) peptide and APCs (5×10^4) or with plate-bound anti-CD3 mAbs in the presence of anti-Ly49A mAbs or IgG2a isotype control mAbs as described above. For stimulation with coated beads, polystyrene latex beads ($5 \times 10^6/\text{ml}$; Polysciences, Warrington, PA) were incubated in PBS with the indicated Abs at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 1.5 h at 37°C, followed by washing with PBS and blocking with 10% FCS. T cells (1×10^5) were incubated in a ratio of 1:2 with beads in 96-well plates.

After 24 h, 50 μl of supernatant was assayed for IL-2 production using the IL-2-dependent cell line CTLL-2 as described previously (15). Ab-blocking assays were performed in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ purified anti-ligand mAbs or 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ F(ab')₂ anti-Ly49A.

RT-PCR

Five micrograms of total RNA was reverse transcribed using 400 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Rockville, MD) and oligo(dT) primer. The cDNA equivalent of 500 ng of RNA was amplified by PCR with 200 μM each of dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 200 nM specific oligonucleotide primers, and 2.5 U *Taq* Polymerase. The amplification cycles were 95°C for 1 min, 55°C for 1 min,

and 72°C for 1 min 30 s. PCR was performed for 20 cycles for β -actin and 30 cycles for Fas and Fas ligand (FasL).

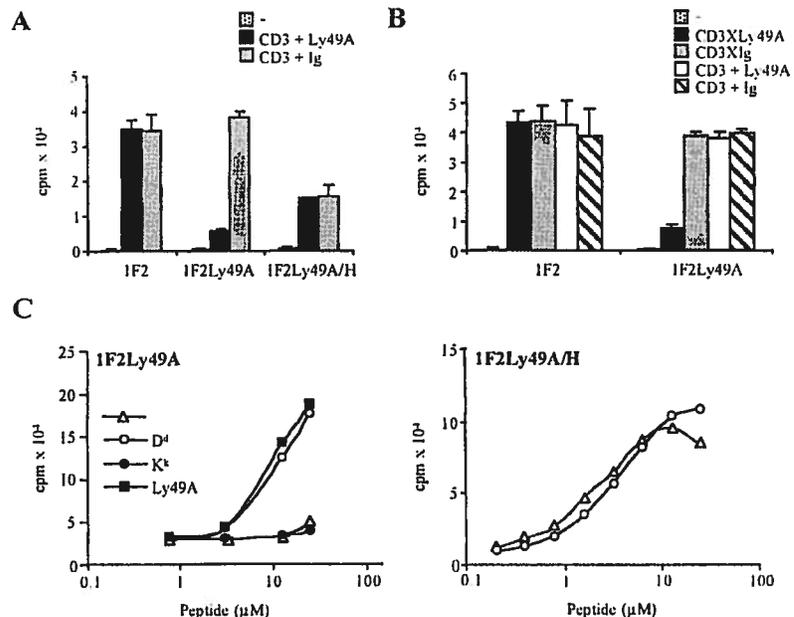
Results

Ly49A ligation down-modulates CD3-induced IL-2 secretion

We generated several transfected T cell hybridoma clones expressing Ly49A or a chimeric version containing the entire extracellular and transmembrane domain of Ly49A fused to the intracytoplasmic domain of Ly49H (Ly49A/H). Ly49H is a prototype of activating Ly49 receptors. It interacts via its transmembrane region with the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-containing molecule DAP12 and is devoid of an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its intracytoplasmic domain (16). Therefore, any Ly49A ITIM-mediated inhibitory signal should be absent in the Ly49A/H chimera. Multiple clones were established with the Ly49A and Ly49A/H constructs and experiments were performed with clones expressing comparable levels of TCR/CD3 at their cell surface. Stimulation of the parental and transfected cell lines with anti-CD3 mAbs coated on plastic (Fig. 1A) or on beads (Fig. 1B) induced IL-2 secretion. Coimmobilization of anti-CD3 and anti-Ly49A mAbs reduced dramatically CD3-induced IL-2 secretion in clones expressing Ly49A (Fig. 1, A and B). In contrast, IL-2 secretion was not affected by cross-linking of CD3 and the Ly49A/H chimera. This result indicates that Ly49A-mediated inhibition of IL-2 secretion likely occurs through its cytoplasmic domain. Moreover, given that the Ly49A- and Ly49A/H-transfected cells express similar levels of the Ly49A extracellular domain (data not shown), these data demonstrate that anti-Ly49A mAbs did not affect the activation of the cells by steric hindrance of TCR/CD3 cross-linking with anti-CD3 mAbs. Coengagement of Ly49A and CD3 is required to down-modulate IL-2 secretion since inhibition was not observed with anti-Ly49A and anti-CD3 mAbs coated on separate beads (Fig. 1B).

To evaluate the effect of Ly49A binding to its MHC class I ligand on IL-2 secretion, Ly49A- or Ly49A/H-expressing cells were stimulated with increasing concentrations of peptide presented by I-E^p on H-2D^dK^k APCs (Fig. 1C). Ly49A expressing cells did not secrete significant amounts of IL-2 in response to Ag

FIGURE 1. Ligation of Ly49A inhibits CD3-induced IL-2 secretion. *A*, The parental (1F2) and transfected (1F2Ly49A and 1F2Ly49A/H) cell lines were left unstimulated (–) or were stimulated on mAb-coated plates with a combination of anti-CD3 and anti-Ly49A mAbs (CD3 + Ly49A) or anti-CD3 and IgG2a control mAbs (CD3 + Ig). IL-2 secretion was evaluated as described in *Materials and Methods*. Similar results were obtained in at least three experiments and with two independent clones expressing either Ly49A or Ly49A/H. *B*, 1F2 cells were left unstimulated (–) or were stimulated with mAbs coated on beads. Anti-CD3 and anti-Ly49A mAbs or anti-CD3 and control mAbs were coated on the same beads (CD3XLy49A or CD3XIg) or on separate beads (CD3 + Ly49A or CD3 + Ig). Supernatants were analyzed as described in *A*. *C*, 1F2 cells expressing either Ly49A (1F2Ly49A) or Ly49A/H (1F2Ly49A/H) were stimulated with increasing concentrations of β -galactosidase peptide presented by CH-27-E^p in the absence (Δ) or presence of anti-H-2D^d mAbs (O), F(ab')₂ of anti-Ly49A (■) or anti-H-2K^k mAbs (●).



stimulation. Blocking the Ly49A-ligand interaction with either anti-H-2D^d Abs or with F(ab')₂ of anti-Ly49A mAbs restored the IL-2 response in cells expressing Ly49A (Fig. 1C). Moreover, mAbs against H-2K^k, which is expressed on the APCs but is not a ligand for Ly49A, did not restore IL-2 secretion of Ly49A-expressing cells (Fig. 1C). As expected, levels of IL-2 secreted by Ly49A/H-transfected cells were not affected by the binding of the Ly49A/H chimeric receptor to H-2D^d (Fig. 1C). Altogether, these results demonstrate that there is a specific inhibition of CD3-induced IL-2 secretion upon Ly49A binding to its ligand H-2D^d.

Ly49A signaling inhibits CD3-induced apoptosis

Cross-linking with anti-CD3 and anti-Ly49A mAbs completely inhibited CD3-induced cell death in clones expressing Ly49A, whereas this treatment had no effect on clones expressing the chimeric Ly49A/H molecule (data not shown). The number of apoptotic cells was quantified by flow cytometry analysis of hypodiploid DNA and annexin V binding. In cells expressing Ly49A, treatment with anti-Ly49A mAbs diminished considerably the number of cells undergoing both early (annexin V single positive) and late (7-AAD/annexin V double positive) apoptosis as compared with cells treated with anti-CD3 mAbs alone (Fig. 2A). In contrast, a similar percentage of cells undergoing apoptosis was found in Ly49A/H-expressing cells treated or not treated with anti-Ly49A mAbs. Blocking Ly49A-ligand interaction increased significantly the percentage of T cells undergoing apoptosis, whereas the same treatment had no effect on cells expressing the chimeric Ly49A/H receptor. (Fig. 2B). These results confirm that binding of

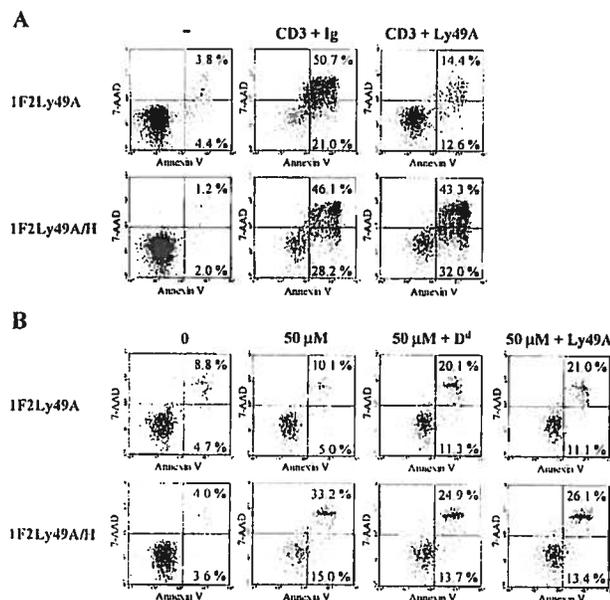


FIGURE 2. Effect of Ly49A ligation on CD3-induced binding of annexin V. *A*, 1F2 cells expressing either Ly49A (1F2Ly49A) or Ly49A/H (1F2Ly49A/H) were left unstimulated (-) or were stimulated on mAb-coated plates with anti-CD3 and anti-Ly49A mAbs (CD3 + Ly49A) or anti-CD3 and control mAbs (CD3 + Ig) for 16 h. Cells were stained with 7-AAD and annexin V-PE. *B*, 1F2 cells expressing either Ly49A or Ly49A/H were incubated with CH-27-IE^p in the absence (0) or presence of 50 μM β-galactosidase peptide (50 μM). When added, anti-H-2D^d mAbs (D^d) or F(ab')₂ of anti-Ly49A (Ly49A) were indicated. Only T cells are shown by gating electronically I-E-negative cells. The percentage of cells undergoing early (annexin V single positive) and late (7-AAD/annexin V double positive) apoptosis is indicated.

Ly49A to its ligand inhibited Ag-induced apoptosis. A marked inhibition by Ly49A of TCR-induced apoptosis was also detected by propidium iodide staining of subdiploid DNA (Fig. 3A). Fas-mediated apoptosis is potentiated by IL-2 (17, 18). Addition of IL-2 did not restore AICD when Ly49A and CD3 were coligated in clones expressing Ly49A (data not shown). Therefore, the inhibition of apoptosis by Ly49A is not the consequence of diminished IL-2 production. In addition, ligation of Ly49A failed to protect cells against glucocorticoid-induced cell death (Fig. 3B).

Ly49A protects cells from AICD by inhibiting FasL expression

TCR/CD3-mediated cell death in T cell hybridomas is primarily induced through Fas (19, 20). To investigate the mechanism of Ly49A-mediated resistance to AICD, we analyzed the effect of Ly49A ligation on CD3-induced up-regulation of Fas and FasL expression (Fig. 4). Activation-induced mRNA expression of FasL was greatly reduced when CD3 and Ly49A were coligated in clones expressing Ly49A (Fig. 4A). In contrast, CD3-induced Fas mRNA and Fas cell surface expression were not affected by Ly49A cross-linking (Fig. 4). As expected, ligation of Ly49A/H did not affect CD3-induced up-regulation of Fas and FasL expression (Fig. 4). These data suggest that Ly49A inhibits AICD by preventing FasL expression. Moreover, since CD3-induced up-regulation of Fas was not inhibited by Ly49A, this result demonstrates that CD3-mediated activation events are not all negatively regulated by Ly49A.

Discussion

Our results clearly demonstrate that inhibition of IL-2 secretion and AICD by Ly49A is mediated by the intracytoplasmic domain of Ly49A since the chimeric Ly49A/H does not deliver inhibitory signals. Ly49A contains within its cytoplasmic domain an ITIM that represents a potential binding site for Src homology 2 domain-containing phosphatases. The protein tyrosine phosphatase SHP-1

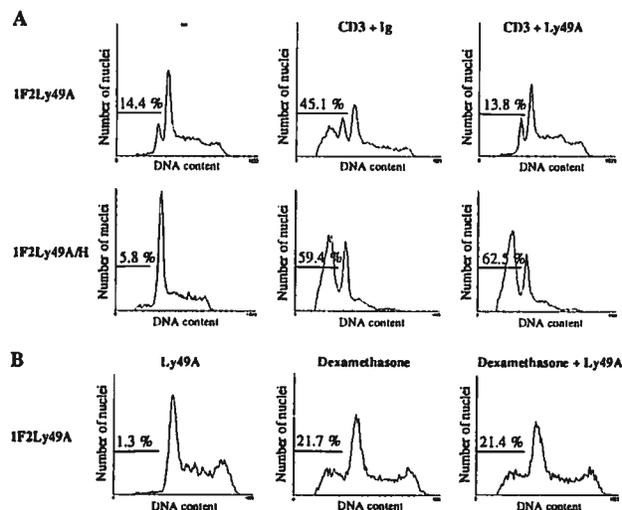


FIGURE 3. Ly49A prevents CD3-induced appearance of hypodiploid DNA. *A*, 1F2 cells expressing either Ly49A (1F2Ly49A) or Ly49A/H (1F2Ly49A/H) were left unstimulated (-) or were stimulated on mAb-coated plates with anti-CD3 and anti-Ly49A mAbs (CD3 + Ly49A) or anti-CD3 and control mAbs (CD3 + Ig) for 16 h. *B*, Ly49A expressing cells were treated with anti-Ly49A mAbs coated on plastic (Ly49A) in the absence or presence of dexamethasone (10⁻⁶ M) for 14 h as indicated. The percentage of hypodiploid nuclei was evaluated with propidium iodide staining and flow cytometry analysis.

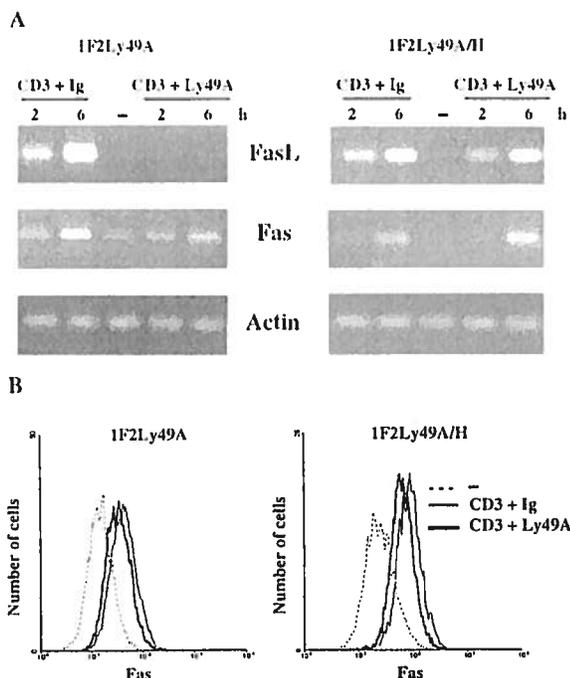


FIGURE 4. Effect of Ly49A ligation on CD3-induced up-regulation of Fas and FasL expression. *A*, 1F2 cells expressing either Ly49A (1F2Ly49A) or Ly49A/H (1F2Ly49A/H) were left unstimulated (–) or were stimulated on mAb-coated plates with anti-CD3 and anti-Ly49A mAbs (CD3 + Ly49A) or anti-CD3 and control mAbs (CD3 + Ig) for 2 and 6 h. Total RNA was extracted and expression of the indicated genes was measured by RT-PCR. *B*, 1F2 cells expressing either Ly49A or Ly49A/H were left unstimulated (–, dotted line) or were stimulated on mAb-coated plates with anti-CD3 and anti-Ly49A mAbs (CD3 + Ly49A, thick solid line) or anti-CD3 and control mAbs (CD3 + Ig, thin solid line) for 16 h. FACS analysis of cell surface expression of Fas was performed using Jo2 Ab and FITC-labeled goat anti-hamster Ig.

binds to tyrosine-phosphorylated Ly49A but the signaling molecules that are in vivo substrates for SHP-1 are presently unknown (21). In Jurkat cells transfected with Ly49G2 receptor, ligation of Ly49 has no effect on CD3-induced tyrosine phosphorylation (22). In the 1F2 T cell hybridoma, Ly49A does not seem to affect the phosphorylation levels of the major tyrosine-phosphorylated proteins induced after CD3 stimulation (our unpublished data). Although it is likely that Ly49A-mediated inhibitory signal(s) involved in part dephosphorylation of a key molecule by SHP-1, this event might be transient and therefore difficult to detect. It is important to note that the intracellular signals required for CD3-induced Fas up-regulation are not inhibited by Ly49A. Altogether these findings demonstrate that Ly49A selectively interferes with some TCR-induced signaling events. Moreover, the observation that the inhibitory effect requires coligation of Ly49A with the TCR suggests that Ly49A might be brought to the vicinity of the TCR-CD3 complex in the course of Ag-mediated T cell activation. Additional experiments are required to define the molecular basis of Ly49A involvement in TCR signaling.

What is the mechanism of Ly49A-mediated inhibition of FasL expression? NF- κ B, NF-AT, c-Myc, and members of the early growth response family of transcription factors, early growth factor 2 and early growth factor 3, contribute to TCR-induced FasL promoter activity (23–26). In addition, it was recently shown that the transcriptional factor MHC class II transactivator is a negative

regulator of NF-AT-mediated FasL expression upon CD3 stimulation (27). Studies are in progress to examine whether Ly49A inhibits the activity and/or expression of these regulators of FasL expression.

The Ly49A-mediated down-modulation of TCR-induced IL-2 secretion and apoptosis may be an important mechanism in regulating immune system homeostasis. Importantly, since most of the CD8⁺Ly49⁺ T cells have a memory phenotype (6), Ly49 inhibitory receptors might play an important role in vivo in the formation or the maintenance of memory cells. Future studies will reveal whether expression of Ly49 receptors on normal T cells correlates with their resistance to AICD.

Acknowledgments

We thank Drs. Claude Daniel for his precious help in this project and for providing 1F2 and CH-27-F^p cell lines, François Denis for providing Fas and FasL PCR primers, Albert Descoteaux for critical reading of this manuscript, and Fumio Takei for providing Ly49A and Ly49H cDNAs.

References

1. Takei, F., J. Brennan, and D. L. Mager. 1997. The Ly-49 family: genes, proteins and recognition of class I MHC. *Immunol. Rev.* 155:67.
2. Long, E. O. 1999. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 17:875.
3. MacDonald, H. R., R. K. Lees, and W. Held. 1998. Developmentally regulated extinction of Ly-49 receptor expression permits maturation and selection of NK1.1⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 187:2109.
4. Ortaldo, J. R., R. Winkler-Pickett, A. T. Mason, and L. H. Mason. 1998. The Ly-49 family: regulation of cytotoxicity and cytokine production in murine CD3⁺ cells. *J. Immunol.* 160:1158.
5. Bendelac, A., M. N. Rivera, S. H. Park, and J. H. Roark. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:535.
6. Coles, M. C., C. W. McMahon, I. Takizawa, and D. H. Raulet. 2000. Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors. *Eur. J. Immunol.* 30:236.
7. Held, W., D. Cado, and D. H. Raulet. 1996. Transgenic expression of the Ly49A natural killer cell receptor confers class I major histocompatibility complex (MHC)-specific inhibition and prevents bone marrow allograft rejection. *J. Exp. Med.* 184:2037.
8. Zajac, A. J., R. E. Vance, W. Held, D. J. Sourdive, J. D. Altman, D. H. Raulet, and R. Ahmed. 1999. Impaired anti-viral T cell responses due to expression of the Ly49A inhibitory receptor. *J. Immunol.* 163:5526.
9. Brawand, P., F. A. Lemonnier, H. R. MacDonald, J. C. Cerottini, and W. Held. 2000. Transgenic expression of Ly49A on T cells impairs a specific antitumor response. *J. Immunol.* 165:1871.
10. Oberg, L., M. Eriksson, L. Fahlen, and C. L. Sentman. 2000. Expression of Ly49A on T cells alters the threshold for T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 30:2849.
11. Peacock, C. D., M. Y. Lin, J. R. Ortaldo, and R. M. Welsh. 2000. The virus-specific and allospecific cytotoxic T-lymphocyte response to lymphocytic choriomeningitis virus is modified in a subpopulation of CD8⁺ T cells coexpressing the inhibitory major histocompatibility complex class I receptor Ly49G2. *J. Virol.* 74:7032.
12. Pauza, M., K. M. Smith, H. Neal, C. Reilly, L. L. Lanier, and D. Lo. 2000. Transgenic expression of Ly-49A in thymocytes alters repertoire selection. *J. Immunol.* 164:884.
13. Daniel, C., S. Horvath, and P. M. Allen. 1998. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 8:543.
14. Daniel, C., A. Grakoui, and P. M. Allen. 1998. Inhibition of an in vitro CD4⁺ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J. Immunol.* 160:3244.
15. Nemorin, J. G., P. Laporte, G. Berube, and P. Duplay. 2001. p62^{dnk} negatively regulates cd2 signaling in Jurkat cells. *J. Immunol.* 166:4408.
16. Smith, K. M., J. Wu, A. B. Bakker, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 1998. Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *J. Immunol.* 161:7.
17. Lenardo, M. J. 1991. Interleukin-2 programs mouse α B T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353:858.
18. Kneitz, B., T. Herrmann, S. Yonehara, and A. Schimpl. 1995. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 25:2572.
19. Brunner, T., R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch, C. F. Ware, et al. 1995. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373:441.
20. Ju, S. T., D. J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el-Khatib, D. H. Sherr, B. Z. Stanger, and A. Marshak-Rothstein. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373:444.

21. Ugolini, S., and E. Vivier. 2000. Regulation of T cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 12:295.
22. Ortaldo, J. R., R. Winkler-Pickett, J. Willette-Brown, R. L. Wange, S. K. Anderson, G. J. Palumbo, L. H. Mason, and D. W. McVicar. 1999. Structure/function relationship of activating Ly-49D and inhibitory Ly-49G2 NK receptors. *J. Immunol.* 163:5269.
23. Rengarajan, J., P. R. Mittelstadt, H. W. Mages, A. J. Gerth, R. A. Kroczek, J. D. Ashwell, and L. H. Glimcher. 2000. Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity* 12:293.
24. Kasibhatla, S., L. Genestier, and D. R. Green. 1999. Regulation of Fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor κ B. *J. Biol. Chem.* 274:987.
25. Mittelstadt, P. R., and J. D. Ashwell. 1998. Cyclosporin A-sensitive transcription factor Egr-3 regulates Fas ligand expression. *Mol. Cell Biol.* 18:3744.
26. Kasibhatla, S., H. M. Beere, T. Brunner, F. Echeverri, and D. R. Green. 2000. A "non-canonical" DNA-binding element mediates the response of the Fas-ligand promoter to c-Myc. *Curr. Biol.* 10:1205.
27. Gourley, T. S., and C. H. Chang. 2001. The class II transactivator prevents activation-induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression. *J. Immunol.* 166:2917.

Chapitre 5 :

Discussion générale

Puisque les résultats issus de ce projet de recherche ont été déjà analysés en profondeur dans la discussion de chacune des publications s'y rattachant, je me limiterai ici à ne reprendre que les points majeurs de ces analyses de façon à dégager leur importance par rapport aux connaissances actuelles du domaine et à les situer dans un contexte plus général. De plus, certains éléments omis précédemment ont été ajoutés, afin de dresser le tableau complet des différents travaux que j'ai effectués. Afin d'en faciliter la compréhension, cette discussion générale est divisée en trois sections (I-III) en référence aux trois articles (I-III) constituant le corps de cette thèse.

PARTIE I

ÉVALUATION DE CANDIDATS POTENTIELS POUR LE GÈNE DE RÉSISTANCE *Cmv1*

Le premier objectif de ce projet de doctorat visait l'identification du récepteur des cellules NK qui code pour le gène *Cmv1* et qui est responsable de la résistance contre l'infection par le MCMV. Dans un premier temps, les molécules de la famille Ly49 avaient été identifiées comme candidats potentiels en raison de leurs propriétés en tant que récepteurs impliqués dans l'initiation de différentes cascades de signalisation des cellules NK et selon leur co-localisation génétique avec *Cmv1*. Trois approches distinctes ont été employées pour atteindre l'objectif visé; établir une cartographie génétique plus précise du NKC, déterminer le patron d'expression des molécules Ly49A, Ly49C, Ly49C/I et Ly49G2 à la surface des cellules NK au cours de l'infection par le MCMV et effectuer la déplétion des sous-populations de cellules NK exprimant ces molécules chez des souris résistantes au MCMV dans le but d'en abolir le phénotype de résistance.

Cartographie génétique

Au moment où nous avons entrepris ces travaux, bien peu d'informations permettaient l'exclusion de quelconque membre du NKC comme candidat pour le *Cmv1* et ce, malgré de multiples efforts pour augmenter la précision de la carte génétique de la région du *Cmv1*. Rappelons que l'organisation de cette région chromosomique est illustrée dans la Figure 1 de la revue bibliographique. L'équipe du Dr Vidal fut la première à rapporter la ségrégation entre les gènes *Cmv1* et *Nkr-p1* (Depatie *et al.*, 1997). Ce résultat éliminait le récepteur correspondant (NK1.1) comme candidat, ce qui fut ultérieurement confirmé par d'autres travaux (Brown *et al.*, 1997a; Forbes *et al.*, 1997). Les études du Dr Vidal ont notamment porté sur l'analyse individuelle d'un grand nombre de souris issues de rétro-croisements de souris hybrides résistantes avec des souris parentales susceptibles [(BALB/c x B6)_{FI} x BALB/c] et [(A/J x B6)_{FI} x A/J]. Ces travaux ont permis d'identifier plusieurs marqueurs génétiques polymorphiques dans la région du *Cmv1*. La co-ségrégation de ces marqueurs et des gènes du NKC est suivie avec une attention particulière chez les animaux présentant un événement de recombinaison dans la région

du *Cmv1*. La détermination du titre viral splénique permet de connaître le phénotype de résistance de la souris et de rendre l'analyse informative pour le patron de ségrégation de ces marqueurs. Ce type d'analyse nous a donc permis de réduire l'intervalle génétique minimal du *Cmv1* de 0,7 à 0,35 cM et d'y positionner plus précisément les gènes *Ly49a*, *Ly49c* et *Ly49g* (Figure 1/Article I). De plus, l'étude nous a permis d'exclure *Cd94* et *Nkg2d* comme candidats puisque nous avons observé une ségrégation entre ces gènes et *Cmv1*. Une co-ségrégation de *Cmv1* et des gènes *Ly49* a été observée chez toutes les souris présentant un événement de recombinaison dans la région du *Cmv1* (Figure 1/Article I). Il pourrait donc y avoir identité entre *Cmv1* et un des gènes *Ly49*.

Depuis la publication de notre étude en 1999, plusieurs autres cartes génétiques du NKC ont été publiées. Notamment, l'équipe de Scalzo a présenté des résultats qui suggèrent qu'il y a ségrégation entre les gènes *Ly49* et *Cmv1* (Brown *et al.*, 1999). Ces résultats, qui n'ont pu être confirmés par les travaux ultérieurs de la même équipe (Scalzo *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001b), pourraient être attribuables à des conclusions déduites à partir de phénotypes intermédiaires de résistance. La carte la plus détaillée a été établie par l'équipe du Dr Vidal (Depatie *et al.*, 2000). Malgré le fait que cette étude n'ait pu permettre l'exclusion d'autres NKR comme candidats pour le *Cmv1*, elle a tout de même permis de cartographier 14 des gènes *Ly49* ainsi que 3 nouveaux gènes. Des gènes régissant certaines des fonctions des cellules NK sont aussi localisés dans le NKC et un effort important est consacré à l'identification des molécules correspondantes. À titre d'exemple, les équipes de Yokoyama et Ryan ont démontré que le gène *Ly49d* correspond à *Chok* (voir la revue bibliographique).

Plusieurs paramètres rendent laborieuse l'identification du *Cmv1* par cartographie génétique. En effet, la région NKC est vaste et elle contient une grande quantité de gènes, dont une grande proportion présente des allèles polymorphes qui sont difficilement dissociables des événements de recombinaison forts nombreux dans cette région ("hotspots"). Il est donc très difficile d'identifier les mutations pouvant être associées aux phénotypes *Cmv1^r* et *Cmv1^s* (Brown *et al.*, 1997b). Alors, malgré qu'il soit établi que

Cmv1 est exprimé par les cellules NK, que son locus est situé dans le NKC et qu'il montre des différences alléliques entre la souris résistante B6 et la souris susceptible BALB/c. il demeure néanmoins que plusieurs candidats répondent à ces critères. Bref, il y a trop de candidats dans une région trop vaste. Jusqu'à maintenant, ce type d'analyse a donc servi davantage à éliminer des candidats potentiels (NK1.1, CD94, NKG2D) plutôt qu'à identifier le gène recherché (Depatie *et al.*, 1997; Depatie *et al.*, 1999). Si la cartographie génétique ne peut à elle seule permettre d'identifier le correspondant du *Cmv1*, des études immunologiques impliquant par exemple, l'utilisation d'AcMo dirigés contre les récepteurs codés par des gènes localisés dans le NKC peuvent la compléter. Ces AcMo peuvent permettre, par exemple, l'analyse comparative de l'expression de ces gènes chez les souris résistantes et susceptibles ou encore l'élimination des populations cellulaires correspondantes chez une souris résistante afin de tenter d'abolir le phénotype *Cmv1'*. Toutefois, il demeure toujours possible que les AcMo utilisés puissent reconnaître plus d'une molécule et peut être même des protéines chimériques. En effet, tel que suggéré par Makrigiannis et Anderson, l'identification de gènes constitués d'exons provenant de différents gènes *Ly49* connus pourrait se traduire par l'expression des protéines correspondantes et compliquer considérablement l'analyse des molécules Ly49 (Makrigiannis et Anderson, 2001). Ces auteurs proposent d'ailleurs que ces événements de recombinaison puissent représenter un mécanisme de diversification du répertoire des molécules Ly49. Par exemple, le gène *Ly49u* retrouvé chez la souris 129/J, est constitué des exons correspondants aux portions intracellulaire et transmembranaire et à la tige de *Ly49h*, connu pour être un récepteur d'activation, ainsi que des exons correspondants au CRD de *Ly49i*, connu pour être un récepteur d'inhibition. La protéine correspondante qui devrait à la fois être reconnue par les AcMo dirigés contre le CRD de Ly49I (SW5E6 et 5GA5) et se lier aux mêmes ligands que Ly49I, devrait par conséquent avoir une fonction activatrice comme Ly49H. À l'inverse, la protéine correspondante au gène *Ly49o* de la souris 129/J qui devrait lier les mêmes ligands que le récepteur Ly49D activateur, aurait une fonction inhibitrice puisqu'elle posséderait les portions transmembranaire et intracellulaire du récepteur Ly49A inhibiteur. Il est donc essentiel de confirmer les résultats obtenus à l'aide d'AcMo par des analyses génétiques. La signification biologique

de ces chimères, identifiées pour l'instant uniquement au niveau génomique, est encore inconnue. Chose certaine, leur existence ne facilite pas la dissection génétique du NKC.

On peut d'autre part envisager l'identification de nouveaux marqueurs polymorphiques dans la région où se situe ce gène de résistance et la production ou l'identification d'une souris recombinante dans la région du *Cmv1*, qui serait susceptible à l'infection et dont la structure chromosomale de cette région pourrait se différencier en un seul point du NKC des souris résistantes. Évidemment, une telle souris représente l'outil idéal qui toutefois, nécessite l'utilisation des deux autres approches mentionnées, immunologique et génétique, pour que les observations que son utilisation permettrait, puissent être confirmées hors de tout doute. C'est précisément la situation dont ont tiré profit trois équipes qui ont rapporté au cours de l'été 2001, que la molécule Ly49H exprimée à la surface des cellules NK serait responsable de la résistance à l'infection par le MCMV. Plusieurs observations soutiennent cette conclusion : i) le gène *Ly49h* est localisé dans le NKC (Brennan *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997a); ii) le gène *Ly49h*, l'ARNm et la protéine correspondants, sont absents chez les souris de phénotype *Cmv1^s* (BALB/c et BXD-8 qui est une souris recombinante consanguine de phénotype *Cmv1^s* malgré qu'elle possède une région *Cmv1* apparemment caractéristique de la souris B6) mais, présents chez la souris B6 de phénotype *Cmv1^r* (Smith *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001a; Daniels *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001); iii) l'élimination des cellules Ly49H⁺ chez la souris *Cmv1^r* abolit le phénotype de résistance (Brown *et al.*, 2001a; Daniels *et al.*, 2001), iv) le pourcentage de cellules NK Ly49H⁺ chez des souris transgéniques sur fond H-2^d est en corrélation avec le niveau de résistance au MCMV (S. Vidal, communication personnelle), v) une souris chez qui l'ITAM de la molécule DAP12 est non-fonctionnel (Ly49H interagit avec DAP12 pour être exprimé en surface cellulaire et pour pouvoir transmettre son signal d'activation (Smith *et al.*, 1998; Gosselin *et al.*, 1999)) montre de faibles niveaux d'expression de Ly49H et est susceptible au MCMV (Sjolin *et al.*, 2002) et vi) la molécule m157 qui est un homologue de molécules du CMH-I codé par le MCMV, interagirait directement avec un récepteur inhibiteur des cellules NK des souris susceptibles et avec un récepteur activateur des cellules NK de la souris résistante B6

(Arase *et al.*, 2002). Ces deux récepteurs seraient très homologues. L'hypothèse proposée par les auteurs de ces travaux est que l'interaction entre m157 et Ly49H conférerait le phénotype de résistance contre le MCMV.

Dans la poursuite de l'objectif de l'article I, puisque nous n'avons pas réussi par cartographie génétique à identifier le gène responsable du phénotype de résistance au MCMV, nous avons alors procédé à une étude complémentaire dont le but était d'abord de suivre les variations phénotypiques dans la population NK au cours de l'infection et ensuite, d'évaluer les conséquences de l'élimination sélective de certaines sous-populations de cellules NK sur la résistance des souris infectées.

Expression des molécules Ly49 au cours de l'infection

Les ligands des récepteurs Ly49 sont des molécules du CMH-I dont le niveau d'expression chute de façon importante au cours de l'infection par MCMV (Campbell et Slater, 1994; Slater et Campbell, 1997). On peut donc s'attendre à une augmentation de la sensibilité des cellules infectées face aux cellules NK, sauf s'il y a intervention des molécules leurres telles m144 chez la souris et UL16, UL18 et UL40 chez l'humain (voir revue bibliographique). L'expression de telles molécules pourraient favoriser la prolifération de sous-populations particulières de cellules NK ou inversement leur disparition par apoptose si elles se lient à des récepteurs activateurs. En outre, comme l'expression des récepteurs Ly49 est régulée à la baisse en présence de leurs ligands (Karlhofer *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 1995; Held *et al.*, 1996b; Sundback *et al.*, 1996; Gosselin *et al.*, 1997) et puisqu'un tel phénomène ne se manifeste pas uniquement au cours du développement des cellules NK (Kase *et al.*, 1998; Korten *et al.*, 1999), il est possible que des variations puissent survenir dans la taille relative des sous-populations NK au cours de l'infection ainsi que dans le niveau d'expression de leurs différents récepteurs.

C'est avec cette idée en tête que nous avons procédé à l'analyse de la taille relative des sous-populations NK exprimant les récepteurs Ly49A, Ly49C, Ly49C/I et Ly49G2 et que

nous avons suivi les variations du niveau d'expression de chacun de ces récepteurs, au cours de l'infection de souris résistantes au MCMV (Figure 3/Article I). Mentionnons ici que de ces quatre récepteurs, seuls Ly49C et Ly49I possèdent un ligand chez la souris B6. Seul le niveau d'expression de Ly49G2 augmente de façon drastique au cours de l'infection. Puisque cette observation se manifeste suite à l'établissement du phénotype de résistance, il serait étonnant que la population de cellules NK Ly49G2⁺ y participe de façon majeure. La démonstration que *Ly49g* possède un site d'initiation de la transcription différent des autres gènes *Ly49* pourrait expliquer cette observation (Wilhelm *et al.*, 2001). Néanmoins, il est intéressant de noter qu'une équipe vient de rapporter le même type de patron pour l'expression du récepteur inhibiteur nommé "Killer cell Lectin-Like receptor G1" (KLRG1), que celui de Ly49G2 (Robbins *et al.*, 2002). Selon cette étude, suite à l'établissement du phénotype de résistance, la population de cellules NK qui produit davantage d'IFN γ est de phénotype KLRG1⁻. Puisque KLRG1 peut inhiber la synthèse d'IFN γ et l'activité cytotoxique des cellules NK, l'équipe propose alors que ce récepteur puisse être responsable de réguler à la baisse la réponse immune des cellules NK suite à l'infection par le MCMV. Ces résultats suggèrent donc que l'induction de l'expression que nous observons pour Ly49G2 au cours du cycle infection du MCMV, n'est peut être pas sans pertinence.

L'utilisation d'AcMo dirigés contre un épitope spécifique d'un seul récepteur Ly49 nous a permis d'effectuer la première démonstration que le niveau d'expression de différents récepteurs Ly49 exprimés à la surface des cellules NK puisse être modulé sélectivement dans le contexte d'une infection virale. Ces observations suggèrent que les différentes sous-populations de cellules NK puissent jouer divers rôles dans la résistance contre le MCMV. L'équipe de Welsh a par ailleurs démontré que ces manifestations varient selon l'organe et l'infection virale analysés (Tay *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2001). Toutefois, puisque les différents récepteurs analysés ne possèdent pas tous un ligand chez les souches de souris utilisées, il n'est pas surprenant qu'ils puissent être différemment régulés au cours de cette infection. Aussi, il ne faut pas oublier que ces récepteurs pourraient reconnaître des molécules dont l'expression est induite lors de l'infection

virale et qui ne sont pas nécessairement des molécules du CMH-I classiques ou qui ne sont pas dépendantes de ces molécules pour leur présentation. Tel est le cas pour les ligands du récepteur NKG2D dont l'expression est induite dans certaines conditions pathologiques (voir revue bibliographique). Ces récepteurs pourraient aussi reconnaître directement des molécules virales. Toutefois, il est important de souligner que les fluctuations mentionnées semblent traduire le fait que les cellules NK possèdent une certaine sélectivité envers les cellules infectées par le MCMV puisque ces fluctuations sont différentes de celle observées chez les cellules infectées par LCMV, MHV et VV (Tay *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2001).

Il demeure toutefois très difficile de comparer nos résultats avec ceux obtenus par d'autres équipes. En effet, les différentes méthodes d'isolement des cellules NK utilisées n'offrent pas toutes le même niveau de pureté. Par exemple, certaines méthodes d'isolement utilisent la sélection positive via un antigène, qui généralement ne se retrouve pas exclusivement à la surface des cellules NK. La méthode utilisée au laboratoire est basée plutôt sur la sélection négative des types cellulaires autres que les cellules NK pouvant exprimer les récepteurs Ly49. En effet, le processus de purification utilisé élimine les cellules CD4⁺ et CD8⁺, mais pas les cellules T CD4⁻CD8⁻ qui représentent 25% des cellules T NK1.1⁺ spléniques totales (Eberl *et al.*, 1999b). De plus, puisque l'importance de l'expression des molécules Ly49 à la surface de certaines sous-populations de cellules T était encore sous-estimée à l'époque, nos lectures de cytométrie en flux ont été effectuées sur des populations Ly49⁺, plutôt que sur des populations Ly49⁺CD3⁻. Toutefois, puisque la majorité des cellules T exprimant un récepteur Ly49 sont de phénotype CD4⁺ ou CD8⁺, nos résultats ne devraient pas être biaisés de façon importante par leur faible présence potentielle. Il sera cependant important de mieux contrôler ce paramètre à l'avenir.

Aussi, tel que mentionné précédemment, les AcMo utilisés pour caractériser ces récepteurs présentent souvent différentes spécificités croisées. D'où la difficulté de comparer nos résultats à ceux notamment de Tay et collaborateurs, résultats d'ailleurs

discutés dans l'Article I, dans lequel seul l'AcMo dirigé contre Ly49A reconnaissait un épitope spécifique d'un seul récepteur (Tay *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2001). À l'exception de 5GA5, les AcMo anti-Ly49 utilisés au laboratoire pour l'analyse de l'expression de ces molécules au cours de l'infection reconnaissent un épitope propre à un seul récepteur.

Tel que je viens de le mentionner, nous avons observé que les récepteurs Ly49 sont modulés différemment lors de l'infection par le MCMV, ce qui suggère que certaines des sous-populations les exprimant pourraient jouer un rôle auxiliaire dans la résistance à cette infection en secondant la population Ly49H⁺. Or, plusieurs observations nous permettent de croire qu'une(des) molécule(s) des cellules NK autre(s) que Ly49H pourrait(en)t effectivement être impliquée(s). Tout d'abord, n'oublions pas que la population cellulaire Ly49H⁺ peut exprimer d'autres molécules inconnues ou dont le rôle n'est pas encore identifié et qui n'était pas ciblées par les études publiées à l'été 2001. À ce titre, les effets physiopathologiques observés suite à l'élimination de la population Ly49H⁺ sont observés dans la rate et le foie (Daniels *et al.*, 2001). Rappelons que le *Cmv1* ne contrôle pas l'infection dans le foie (Scalzo *et al.*, 1990). Ensuite, l'injection de l'AcMo anti-Ly49H chez la souris B6 ne permet pas d'atteindre des titres viraux aussi élevés que ceux obtenus à l'aide de l'AcMo PK136 anti-NK1.1 (Daniels *et al.*, 2001). Finalement, *Ly49h* serait plutôt éloigné de *Cmv1* selon certaines cartes génétiques (Forbes *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1999; Scalzo *et al.*, 1999). Donc dans l'ensemble, ces observations suggèrent que la population Ly49H⁺ pourrait être secondée afin d'établir un phénotype de résistance face au MCMV. Tant que toutes les molécules Ly49 et leurs ligands ne seront pas identifiés, il demeurera difficile de comprendre les causes et les conséquences des fluctuations de leur niveau d'expression et de la proportion des cellules qui les expriment. Dans cet ordre d'idée, une des hypothèses de ce projet de doctorat était que l'avidité des récepteurs Ly49 exprimés à la surface des cellules immunes module leur capacité fonctionnelle. Or, une situation pathologique telle qu'une infection, peut par le biais de cytokines par exemple, produire la modulation du niveau d'expression des récepteurs Ly49 et/ou des molécules du CMH-I, altérer la nature de ces molécules en y

intégrant un peptide de nature virale et ainsi affecter l'affinité avec laquelle les récepteurs Ly49 les reconnaissent, induire l'expression d'homologues viraux des molécules du CMH-I à la surface des cellules infectées et par le fait même protéger ces dernières contre l'attaque des cellules NK alors dupées, et finalement, altérer la proportion des effecteurs cellulaires selon l'organe et le moment de l'infection. Globalement, les trois paramètres définissant l'avidité peuvent être affectés dans le cours d'une infection; le niveau d'expression du récepteur, le niveau d'expression de son ligand et l'affinité du récepteur envers son ligand. La vérification de l'hypothèse selon laquelle l'avidité des récepteurs Ly49 exprimés à la surface des cellules immunes module leur capacité fonctionnelle, a d'ailleurs fait le sujet de l'article II de cette thèse et sera commentée dans la partie II de cette discussion.

Parmi les différentes techniques pouvant permettre de compléter l'analyse par cartographie génétique, nous avons opté pour celle visant l'abolition du phénotype de résistance d'une souris *Cmv1^r* en éliminant sélectivement certaines sous-populations de cellules NK.

Déplétion in vivo de sous-populations de cellules NK

La technique d'élimination de populations cellulaires NK par l'injection d'AcMo par voie intrapéritonéale, préalablement à l'inoculation virale, est depuis longtemps exploitée par différentes équipes et a notamment permis d'identifier le rôle déterminant que jouent les cellules NK dans la résistance contre certains pathogènes (revu par Biron *et al.*, 1999). Cette technique nous a permis d'observer que les sous-populations de cellules NK Ly49A⁺, Ly49C⁺, Ly49G2⁺ ou Ly49C/I⁺ ne jouent pas de rôle majeur dans la résistance au MCMV puisque leur déplétion sélective n'affecte aucunement les titres viraux spléniques des souris B6 traitées (Figure 4A/Article I). Ces récepteurs pouvaient dès lors être éliminés comme candidats pour *Cmv1*. Lorsque l'on traite les souris avec un mélange d'AcMo dirigés contre les 3 premiers récepteurs, le phénotype de résistance persiste (Figure 4B/Article I), malgré que la population ciblée représente 75% des cellules NK NK1.1⁺ (résultats non-illustrés). Par contre, grâce à l'utilisation additionnelle de l'AcMo

5GA5. un phénotype de résistance intermédiaire est observé chez les souris traitées avec un mélange d'AcMo dirigés contre les 4 récepteurs (Figure 4B/Article 1). Ce traitement cible 85% des cellules NK1.1⁺ (Figure 2/Article 1). Différentes hypothèses mutuellement non-exclusives peuvent expliquer ces résultats i) la molécule responsable du phénotype de résistance au MCMV serait exprimée à la surface de la majorité des cellules NK1.1⁺ qui représentent plus de 80% des cellules NK totales; ii) une quantité seuil de ces cellules NK serait nécessaire pour établir le phénotype de résistance et elle se situerait environ entre 15 et 25% des cellules NK1.1⁺ et iii) une population cellulaire exprimant une molécule non visée par les protocoles de déplétion utilisés et résiduelle suite aux différents traitements administrés (3 et 4 AcMo) serait responsable du phénotype de résistance. La démonstration récente que la population cellulaire NK Ly49H⁺ est responsable de la résistance au MCMV, concorde avec les deux dernières propositions. En effet, selon les résultats des analyses de RT-PCR quantitatif obtenus par l'équipe de Takei, 20% des cellules NK totales exprimeraient le récepteur Ly49H, 24% des cellules NK exprimant Ly49A, Ly49C et/ou Ly49G2 (Ly49A/C/G2⁺) exprimeraient Ly49H (Ly49H⁺) (Kubota *et al.*, 1999b; Takei *et al.*, 2001). Les résultats produits par cette technique, même s'ils sont basés sur la présence de l'ARNm correspondant à chacune de ces molécules plutôt que sur la présence de protéines exprimées en surface cellulaire, reflètent assez fidèlement la réalité tel que confirmé pour les différents récepteurs pour lesquels on possède des AcMo (Depatie *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2001). Selon les analyses de cytométrie en flux effectuées à l'aide d'AcMo anti-Ly49H, environ 50% des cellules NK B6 exprimeraient cette molécule (Smith *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001a; Daniels *et al.*, 2001; Dokun *et al.*, 2001b). L'équipe de S. Vidal a d'ailleurs obtenu les mêmes résultats à l'aide d'un anticorps dirigé contre la portion cytoplasmique de Ly49H (anticorps produit dans le laboratoire de P. Duplay, communication personnelle). Toutefois, les AcMo anti-Ly49H utilisés peuvent aussi reconnaître la molécule Ly49C et/ou Ly49I et 61% des cellules Ly49H⁺ co-exprimeraient Ly49C/I (SW5E6⁺) (Smith *et al.*, 2000). Cette double réactivité pourrait expliquer la divergence des résultats obtenus par les méthodes de RT-PCR et de cytométrie en flux. Toutefois, puisque la totalité de la population exprimant le récepteur Ly49H semble, selon Takei, être comprise au sein de la population Ly49A/C/G2⁺ (et par

conséquent au sein de la population Ly49A/C/I/G2⁺), cela signifie que la persistance du phénotype de résistance au MCMV observée suite aux déplétions employant les stratégies à 3 et 4 AcMo que nous avons utilisées, est la conséquence d'une déplétion partielle de la population Ly49A/C/G2⁺ (Figure 4B/Article I) et par conséquent de la population Ly49H⁺. En effet, 100% des cellules NK Ly49H⁺ exprimeraient au moins un des récepteurs suivants : Ly49A, Ly49C ou Ly49G2 (Kubota *et al.*, 1999b; Takei *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats nous permet d'estimer le nombre minimal de cellules NK Ly49H⁺ nécessaires pour établir le phénotype *Cmv1^r*. En effet, puisque le phénotype de résistance ne présente une altération que dans le cas de la stratégie à 4 AcMo, cela indique que la quantité seuil de cellules Ly49H⁺ nécessaires pour établir le phénotype *Cmv1^r* est compromise uniquement par cette dernière et non par la stratégie à 3 AcMo. Cette quantité seuil correspondrait alors au % différentiel de cellules non éliminées, obtenu à l'aide des deux stratégies employées. En sachant que 100% des cellules NK Ly49H⁺ exprimeraient soit Ly49A, Ly49C et/ou Ly49G2 (Ly49A/C/G2⁺) (Kubota *et al.*, 1999b; Takei *et al.*, 2001) et en supposant que les cellules Ly49H⁺ sont uniformément réparties parmi les cellules de la population Ly49A/C/G2⁺ et donc aléatoirement éliminées par les stratégies de déplétions employées, on peut donc évaluer que les cellules Ly49H⁺ sont éliminées à 88% et 93% par les stratégies à 3 et 4 AcMo, respectivement (Figure 4B/Article I). Cela indiquerait qu'entre 7 à 12% des cellules Ly49H⁺ représenteraient le niveau seuil de cellules nécessaires pour établir le phénotype de résistance viral intermédiaire. Selon les analyses de cytométrie de Daniels, 100% des cellules marquées par l'AcMo SW5E6⁺ (Ly49C/I⁺) le sont également par l'AcMo 1F8⁺ (Ly49C/I/H⁺), alors que 40% des cellules 1F8⁺ sont SW5E6⁻ (Ly49C/I). Ceci indique que le phénotype de résistance conservé suite aux déplétions effectuées à l'aide de l'AcMo SW5E6 chez la souris B6 (Tay *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2001), serait attribuable aux 40% de cellules NK Ly49H⁺C/I non visées par la stratégie. D'ailleurs, selon Takei, 38% des cellules Ly49H⁺ n'expriment pas les récepteurs Ly49C et Ly49I (Kubota *et al.*, 1999b; Takei *et al.*, 2001). Donc, environ 40% des cellules Ly49H⁺ seraient suffisantes pour contrôler complètement l'infection par le MCMV. Par contre, lorsque la proportion des cellules NK

Ly49H⁺ est réduite entre 7 à 12%, celles-ci ne parviennent qu'à établir un phénotype de résistance intermédiaire. D'autre part, lors de notre étude, nous avons observé que l'élimination de 80% des cellules NK1.1⁺ par la stratégie à 3 AcMo n'altérait aucunement le phénotype de résistance et que l'élimination de 85% des cellules NK1.1⁺ par la stratégie à 4 AcMo n'altérait que partiellement le phénotype de résistance (Figure 4B/Article 1). Le même type de résultat avait été observé lors de nos expériences préliminaires de déplétions effectuées à l'aide de dilutions sériées de l'AcMo PK136 (voir Figure 5, Annexe D). En effet, les souris B6 présentant une perte de cellules NK1.1⁺ de l'ordre de 87% suite à l'injection d'une certaine quantité de PK136, exprimaient aussi un phénotype de résistance intermédiaire suite à l'inoculation du MCMV. Donc, il semble que le seuil nécessaire au contrôle du MCMV par les cellules NK se situerait environ vers 15% des cellules NK1.1⁺. En résumé, selon l'ensemble de ces résultats, environ de 15 à 40% d'une population (Ly49H⁺) qui représenterait entre 20 et 50% d'un type cellulaire (NK) ne représentant que 3% des splénocytes serait responsable de la résistance contre l'infection par le MCMV. C'est donc dire que cette population a une grande efficacité antivirale avec un effectif cellulaire plutôt faible. En ce sens, il est important de rappeler que l'équipe de Welsh avait observé que le transfert adoptif des populations NK provenant de la souris B6 exprimant un des récepteurs Ly49 (Ly49A, Ly49C, Ly49D ou Ly49G2) conférait à la souris BALB/c le phénotype de résistance au MCMV (Tay *et al.*, 1999). Puisque la proportion de cellules NK exprimant le récepteur Ly49H représente de 18 à 29% de chacune de ces sous-populations Ly49⁺ (Ly49A⁺, Ly49C⁺, Ly49D⁺ ou Ly49G2⁺), il semblerait donc qu'une faible proportion de cellules Ly49H⁺ soit en effet suffisante pour établir le phénotype *Cmv1^r* (pourcentages relatifs calculés selon les résultats de Takei *et al.*, 2001). En conclusion, l'ensemble de ces observations explique pourquoi nous n'avons pu parvenir à éliminer complètement le phénotype de résistance au MCMV à l'aide des protocoles employant différents mélanges d'AcMo anti-Ly49 (Figure 4/Article 1).

Finalement, il est important de mentionner qu'il est possible que les déplétions que nous avons effectuées puissent avoir affecté les sous-populations de cellules T exprimant

NK1.1 ou l'un des récepteurs Ly49 analysés. Toutefois, plusieurs travaux démontrent que ces dernières ne sont pas impliquées, du moins de façon importante, dans la résistance au MCMV. En effet, le transfert adoptif de cellules NK1.1⁺CD3⁻ provenant de souris résistantes, confère la résistance au MCMV chez les souris susceptibles (Bukowski *et al.*, 1985; Tay *et al.*, 1999). La déplétion de cellules T CD4⁺ et CD8⁺, qui correspond au phénotype de la majorité des cellules T exprimant un récepteur Ly49, n'affecte aucunement le phénotype de résistance au MCMV (Lathbury *et al.*, 1996). De plus, l'utilisation de souris CD1^{-/-} et RAG^{-/-} a permis de démontrer que les caractéristiques propres au phénotype de résistance au MCMV exercé par les cellules NK, ont lieu même en absence des lymphocytes T et B (Dokun *et al.*, 2001a). Ainsi, la déplétion de cellules exprimant l'une des molécules Ly49, même si elle parvenait à éliminer une proportion des cellules T, ne semblerait pas pouvoir affecter l'interprétation des résultats observés.

Conclusion et Perspectives de la partie I

L'importance fonctionnelle de certaines sous-populations de cellules NK exprimant certains récepteurs inhibiteurs (Ly49A et Ly49C/I) (Yu *et al.*, 1996) et activateurs (Ly49D) (George *et al.*, 1999b) a déjà été démontrée dans le contexte des rejets de greffes. La démonstration que la population de cellules NK Ly49H⁺ est responsable de la résistance à l'infection par le MCMV, soutient l'hypothèse voulant que les différentes sous-populations de cellules NK jouent différents rôles dans diverses fonctions du système immunitaire.

Puisque le MCMV est le virus dont le contrôle est le plus clairement identifié comme étant dépendant des cellules NK, il représente un modèle d'étude privilégié pour les diverses fonctions de ces cellules. Il est évident qu'une dynamique existe entre les réponses immunitaires de l'hôte et les stratégies d'évasion employées par le MCMV. En effet, la puissance et la diversité des subterfuges qu'emploie ce virus pour berner le système immunitaire lui permettent d'établir à la fois un état de latence chez son hôte et un cycle répliatif contrôlé lors de ses périodes de réactivation, évitant ainsi de causer

d'importantes pathologies chez son hôte. La synthèse de cytokines, la présence de cellules auxiliaires ainsi que le contenu cellulaire d'un organe particulier, ne sont que quelques-uns des paramètres qui seront modulés au cours d'une infection virale et qui à leur tour moduleront les fonctions des cellules NK. Par conséquent, la notion d'environnement cellulaire peut devenir une dimension importante pour l'établissement d'un équilibre entre les réponses immunes et les dispositifs d'échappement viraux, d'où la difficulté de reproduire *in vitro* un tel système de relation hôte/virus. La détermination du rôle biologique d'une protéine servant à contrer l'évasion immune dans le contexte d'une infection chez l'hôte, est donc très importante.

Ainsi, les résultats présentés dans l'article 1 démontrent clairement la plasticité des cellules NK dans le cadre d'une infection virale. En effet, par la modification de leur phénotype (modulation du niveau d'expression de leurs récepteurs) et de leur représentation cellulaire (modulation de la taille de différentes sous-populations), les cellules NK pourraient vraisemblablement "s'adapter" à leur environnement immunopathologique de façon à pouvoir établir un phénotype de résistance chez leur hôte, ce qui cadre parfaitement bien avec le modèle de la "modulation". Puisque chacun des NKR semble modulé différemment, ceci pourrait être une indication que les sous-populations de cellules NK correspondantes puissent jouer différents rôles dans la régulation de l'infection par le MCMV. Aussi, ce modèle d'infection nous a permis de vérifier l'existence d'une quantité seuil de cellules NK nécessaire pour établir un phénotype de résistance face au MCMV. La démonstration récente par d'autres équipes que le récepteur Ly49H est responsable de ce phénotype, malgré qu'il ne soit exprimé que sur 20 à 50% des cellules NK, prouve d'ailleurs que ces cellules semblent très efficaces puisque même en faible proportion, elles permettent de monter une attaque puissante contre certains pathogènes. Finalement, la restriction de l'intervalle de confiance minimal dans lequel se trouve le gène *Cmv1* par cartographie génétique nous a permis d'exclure *Cd94* et *Nkg2d* comme gènes pouvant occuper ce locus de résistance. De même, puisque la déplétion sélective des sous-populations de cellules NK exprimant les récepteurs Ly49A, Ly49C,

Ly49C/1 ou Ly49G2, n'a pu permettre d'abolir ce phénotype de résistance chez des souris *Cmv1'*. les gènes respectifs ont pu être exclus comme candidats pour le *Cmv1*.

Plusieurs questions concernant la molécule responsable du phénotype *Cmv1* restent à élucider : la nature de la reconnaissance de l'infection par la population Ly49H⁺ (ligand(s) de Ly49H), le(s) mécanisme(s) utilisé(s) par cette population cellulaire pour parvenir à contrôler l'invasion virale, l'implication directe ou indirecte de cellules auxiliaires, etc. À cet effet, nous avons considéré la possibilité de développer un AcMo dirigé contre un épitope spécifique de la portion extracellulaire de Ly49H, qui est un outil incontournable à l'analyse fonctionnelle de cette molécule. Toutefois, puisque cette portion présente très peu de résidus uniques, cet objectif semblera difficile à atteindre. Cet AcMo permettrait notamment d'évaluer la capacité de la molécule Ly49H de lier différents ligands: interaction qui devrait être interrompue par l'utilisation d'AcMo anti-ligands et anti-Ly49H. Aussi, on pourra étudier la capacité de signalisation de cette molécule d'activation (Smith *et al.*, 1998; Gosselin *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000) dans un contexte de présentation antigénique, tel qu'effectué pour les récepteurs Ly49A et Ly49C dans l'article II. Le système développé à cet effet permet notamment l'analyse de l'impact de la variation des différents paramètres qui définissent l'avidité. Ainsi, ces études nous permettront de mieux comprendre comment l'infection par le MCMV peut berner la majorité des cellules NK, par exemple, en modulant ou en imitant l'expression des ligands de leurs récepteurs, que sont les molécules du CMH-I. D'autre part, il sera intéressant d'observer comment l'introduction du gène *Ly49h* chez une souris susceptible, qui en est dépourvue, peut induire un phénotype de résistance contre l'infection du MCMV. Aussi, la recherche de protéine(s) homologue(s) à Ly49H pourrait identifier d'autre(s) récepteur(s) impliqués dans la résistance virale. Finalement, l'exploration de l'implication de cette population cellulaire dans la résistance contre l'infection par d'autres micro-organismes pathogènes requérant la contribution des cellules NK ou encore, dans d'autres fonctions des cellules NK (rejet de greffes, destruction tumorale, homéostasie immunitaire,...) pourrait fournir des informations intéressantes.

PARTIE II
ÉTUDE DE L'IMPACT DE L'AVIDITÉ DES RÉCEPTEURS LY49
SUR LEUR CAPACITÉ DE SIGNALISATION

Le deuxième volet de ce projet de doctorat consistait à vérifier directement si l'avidité des molécules Ly49 d'inhibition exprimées à la surface de cellules T influence leur capacité à engendrer un signal capable d'interférer avec la cascade de signaux intracellulaires initiée par la stimulation du TCR. Le cas échéant, cela signifierait que la modulation de l'expression de ces récepteurs pourrait constituer un mécanisme de régulation des différentes fonctions des cellules T. Deux des composantes de l'avidité ont été retenues pour notre étude : le niveau d'expression des récepteurs Ly49 et l'affinité de ces récepteurs pour leurs ligands.

Niveau d'expression des récepteurs Ly49

Tel que mentionné précédemment, au moment où nous avons entrepris ces travaux aucune étude n'avait permis d'analyser directement comment les niveaux d'expression physiologiques des récepteurs Ly49 pouvaient moduler leur capacité à transmettre un signal suite à leur interaction avec leurs ligands. La production d'une série de clones présentant des niveaux d'expression des molécules Ly49 de l'ordre de ceux retrouvés à la surface des cellules T CD4⁻CD8⁻, CD4⁺ et CD8⁺ (et des cellules NK) des souris BALB/c (H-2^d) et B6 (H-2^b) (Table 1/Article II, Figure 6/Annexe C), de même que le développement d'un modèle d'étude permettant le co-engagement du TCR et des récepteurs Ly49, nous ont permis de pouvoir effectuer ce type d'analyse. En fait, ce système nous permet de quantifier le signal engendré suite à l'interaction Ly49/CMH-I et ce, par le biais de la force d'inhibition qu'il exerce sur le signal d'activation engendré par l'interaction TCR/SEE/CMH-II, qui entraîne notamment l'activation du NF-AT et la synthèse d'IL-2. L'ajout d'AcMo anti-récepteur ou anti-ligand utilisés en quantités saturantes empêche l'interaction Ly49/CMH-I et par conséquent empêche l'initiation du signal d'inhibition normalement généré par celle-ci ("levée d'inhibition") (Figure 1A/Article II). Le rapport du signal d'activation engendré par l'interaction

TCR/SEE/CMH-II dans les conditions de “levée d’inhibition” sur le signal d’inhibition engendré par l’interaction récepteur/ligand, correspond à l’index d’inhibition (Figure 1B/Article II). Cet index reflète l’amplitude avec laquelle le récepteur Ly49 peut transmettre un signal d’inhibition suite à son interaction avec le ligand présent. L’observation que la levée d’inhibition est dépendante de la concentration d’AcMo anti-récepteur et anti-ligand, constitue un premier indice de l’existence d’une corrélation entre l’accessibilité récepteur/ligand et la puissance de la signalisation engendrée (Figure 1A/Article II). Par ailleurs, le fait que la présence d’un AcMo anti-ligand puisse interrompre l’interaction récepteur/ligand de façon comparable à un AcMo anti-récepteur, peut indiquer soit que la molécule du CMH-I présente est le seul ligand fonctionnel ou accessible de ce récepteur, ou soit que les autres ligands présents sont de très faible affinité (Figures 1, 3 et 4B/Article II).

Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de tracer une courbe de corrélation entre l’index d’inhibition et le niveau d’expression du récepteur Ly49A lorsqu’il interagit avec la molécule H-2D^d (Figure 3C/Article II). En fait, cette courbe indique qu’à un niveau d’expression représentant de 1 à 3 unités d’intensité de fluorescence (MFI) (selon la Figure 3C/Article II), le récepteur Ly49A lorsqu’il interagit avec la molécule H-2D^d, engendre un signal d’inhibition de force suffisante pour qu’il puisse interférer avec le signal d’activation issu de la stimulation du TCR. De plus, cette courbe définit un niveau d’expression de Ly49A (approximativement 7 à 10 de MFI selon Figure 3C/Article II), au-dessus duquel il lui est impossible de générer un signal de force supérieure. Puisque le signal d’inhibition généré via l’interaction Ly49A/H-2D^d conduit à une activation du NF-AT supérieure à ce qui est observé lorsque la cellule n’est pas activée (absence de superantigène ou de molécules du CMH-II), cela indique donc que le signal d’activation issu de la stimulation du TCR n’est pas complètement inhibé via Ly49A dans les conditions utilisées. Le fait que l’index d’inhibition atteigne un plateau lorsque Ly49A est à un niveau d’expression d’environ 10 de MFI pourrait alors être attribuable à une saturation au niveau de la cascade d’inhibition (insuffisance de protéines de signalisation

ou de substrats, par exemple) ou à une insuffisance de ligands de Ly49A (niveaux d'expression ou d'accessibilité trop faibles).

En résumé pour ce qui concerne le niveau d'expression de Ly49A, la fenêtre d'intervention dans laquelle l'interaction Ly49A/H-2D^d peut restreindre l'activation de la cellule T via le TCR se situe sous 10 unités de MFI; valeur au-dessus de laquelle les variations de niveaux d'expression membranaire ne se traduisent pas par des modulations fonctionnelles. C'est dans la portion linéaire de la courbe (entre 1 et 10 et peut être même à des unités de MFI plus faibles) que l'on assiste à une relation directe entre la modulation du niveau d'expression de Ly49A et celle de sa capacité inhibitrice.

Pendant nos travaux, deux équipes ont démontré dans d'autres modèles que l'expression du récepteur Ly49A à la surface de cellules T élève le seuil de réponse du TCR lorsque Ly49A interagit avec H-2D^d (Oberg *et al.*, 2000; Pauza *et al.*, 2000). En effet, une plus grande concentration de peptides reconnus par le TCR est nécessaire pour qu'il enclenche un signal d'activation perceptible chez les cellules T isolées de souris transgéniques pour Ly49A et pour un TCR $\alpha\beta$, comparativement aux cellules provenant de souris parentales. De plus, l'accroissement de cette concentration de peptides est d'autant plus importante lorsque le niveau d'expression de Ly49A à la surface de ces cellules augmente (Oberg *et al.*, 2000). De la même façon, l'équipe de Lo démontre que les souris exprimant Ly49A comme transgène, ont un grand nombre de cellules T autoréactives comparativement aux souris parentales. Puisque l'engagement de Ly49A hausserait le seuil de réponse du TCR, ceci causerait un défaut de la sélection négative de ces cellules lors de leur développement thymique (Pauza *et al.*, 2000).

Nous n'avons pu obtenir une telle courbe de corrélation pour le récepteur Ly49C. Puisque le clone Ly49C^{faible} présente un niveau d'expression deux à trois fois plus élevé que celui retrouvé chez la souris H-2^b qui exprime le ligand de grande affinité de ce récepteur, ceci suggère que le niveau d'expression de ce clone est supérieur ou égal à celui au-dessus duquel il n'y a plus augmentation de l'inhibition fonctionnelle. D'ailleurs, il est important

de noter que pour les clones Ly49A⁺ qui expriment des niveaux d'expression supérieurs à ceux retrouvés chez la souris H-2^d qui exprime le ligand de grande affinité de ce récepteur (MFI supérieurs à 10 unités), on note aussi l'absence de corrélation entre leur niveau d'expression et leur capacité inhibitrice; ils se retrouvent effectivement dans la portion "plateau" de la courbe de corrélation (Figure 3C/Article I). De même, rappelons que les cellules NK Ly49C^{faible} provenant de la souris B6 et les cellules NK Ly49C^{élevé} provenant de la souris BALB/c, ne se distinguent pas fonctionnellement lorsqu'elles interagissent avec des cellules cibles exprimant un ligand de grande affinité de Ly49C (haplotype H-2^b) et ce, malgré que le niveau d'expression de Ly49C qu'elles expriment diffère par un facteur de 10. En effet, les cellules NK Ly49C^{faible} et les cellules Ly49C^{élevé} ne lysent pas du tout les cellules H-2^b (Yu *et al.*, 1996). Puisque le niveau d'expression de Ly49C entre les différents clones que nous avons utilisés ne varie que par un facteur de 3, ceci pourrait donc expliquer notre échec à pouvoir démontrer une différence fonctionnelle entre eux. Toutefois, notre étude démontre que le récepteur Ly49C peut inhiber l'activation issue de la stimulation du complexe CD3/TCR. Puisque la même démonstration a été faite pour les récepteurs Ly49A et Ly49G2 (Held *et al.*, 1996a; Ortaldo *et al.*, 1998; Hanke *et al.*, 1999; Brawand *et al.*, 2000; Fahlen *et al.*, 2000; Oberg *et al.*, 2000; Pauza *et al.*, 2000; Hanke et Raullet, 2001), il est vraisemblable que cette propriété soit en fait commune à tous les récepteurs Ly49 dont la structure est adéquate pour permettre le recrutement de phosphatases intracellulaires.

Affinité des récepteurs Ly49 pour leur(s) ligand(s)

Nos résultats indiquent clairement que l'affinité des récepteurs Ly49 pour leur(s) ligand(s) a une incidence directe sur la puissance du signal d'inhibition qui en découle. En effet, le récepteur Ly49C possède une affinité beaucoup plus faible pour les molécules de l'haplotype H-2^d que pour celles de l'haplotype H-2^b qui engendrent un index d'inhibition plus élevé (Figures 4B et 5/Article II). Certains travaux suggèrent que Ly49C posséderait comme ligands les molécules H-2K^d et H-2D^d sur le fond génétique H-2^d (Tableau 2/Annexe B). Toutefois l'interaction Ly49C/H-2K^d n'a pu être démontré par l'entremise d'une étude fonctionnelle. Nous n'avons pu vérifier ce dernier point puisque le(s)

ligand(s) du récepteur Ly49C de l'haplotype H-2^d sont de trop faible affinité pour engendrer un signal d'inhibition nous permettant d'effectuer, dans notre système, une analyse fonctionnelle comparative significative entre H-2D^d et H-2K^d et ce, malgré que ces molécules soient exprimées à des niveaux du même ordre que ceux retrouvés à la surface des cellules présentatrices d'haplotypes H-2^b (Figure 5/Article II; résultats non publiés). Toutefois, nos résultats indiquent que la liaison de Ly49C avec la molécule H-2K^b serait plus puissante que la somme de la liaison des différentes molécules de l'haplotype H-2^d. D'autres observations appuient le fait que Ly49C puisse avoir une affinité plus grande pour H-2K^b que pour les molécules de l'haplotype H-2^d. Tel que mentionné, outre le fait que la présence de la molécule H-2K^b module à la baisse le niveau d'expression de Ly49C de façon plus importante que celle de la molécule H-2D^d et/ou H-2K^d (Held *et al.*, 1996b; Yu *et al.*, 1996; Gosselin *et al.*, 1997; Fahlen *et al.*, 2001), la population cellulaire NK Ly49C^{faible} peut lyser les cellules cibles d'haplotype H-2^d, contrairement aux cellules cibles d'haplotype H-2^b (Yu *et al.*, 1996).

Identification de ligand(s) fonctionnel(s)

Dans les conditions que nous avons utilisées, il semble que Ly49A ne possède aucun ligand fonctionnel parmi les molécules de l'haplotype H-2^b et que Ly49C ne génère aucune conséquence signalétique perceptible suite à la reconnaissance de la molécule H-2D^b. Le cas de la reconnaissance de la molécule H-2D^b par le récepteur Ly49A est un sujet plus controversé que celui de Ly49C, puisque plusieurs études rapportent que Ly49A puisse reconnaître une molécule d'haplotype H-2^b et engendrer une incidence fonctionnelle. En effet, les souris transgéniques pour Ly49A sur fond H-2^b (dans lequel aucun ligand de ce récepteur n'est exprimé) présentent une perturbation de leur réponse alloréactive (Held *et al.*, 1996a), de leur réponse antivirale (Zajac *et al.*, 1999), de leur réponse antitumorale (Brawand *et al.*, 2000) et de la sélection de leur répertoire de cellules T (MacDonald *et al.*, 1998b; Fahlen *et al.*, 2000; Oberg *et al.*, 2000; Pauza *et al.*, 2000). Outre les résultats obtenus dans les souris transgéniques, des études effectuées à l'aide de tétramères suggèrent aussi que l'interaction Ly49A/H-2D^b puisse avoir lieu (Tableau 2/Annexe B). Toutefois, la validité de ce type d'étude a souvent été remise en

cause. Il a été démontré que la liaison de la forme tétramérique de certaines molécules du CMH-I à leurs récepteurs est influencée par certaines conditions expérimentales. Par exemple, il a été démontré que certaines températures d'incubation, en plus de ne pas être représentatives des conditions retrouvées *in vivo*, affectent les résultats obtenus pour la liaison entre D^b et ses récepteurs (Makrigiannis *et al.*, 2001). D'autre part, l'origine de la molécule β_2m qui est utilisée pour le repliement des tétramères affecte certaines interactions, notamment Ly49A/D^b (Michaelsson *et al.*, 2000). Il est aussi important de noter que la liaison de formes tétramériques de molécules du CMH-I n'est parfois observable que lorsque le récepteur est exprimé à de très hauts niveaux. À titre d'exemple, les cellules NK Ly49A⁺ provenant d'une souris B6 (Ly49A^{élevé}) lient le tétramère D^b contrairement aux cellules Ly49C⁺ de cette même souris (Ly49C^{faible}). Par contre, les cellules NK Ly49C⁺ provenant de souris BALB/c (Ly49C^{élevé}) lient ce tétramère contrairement aux cellules Ly49A⁺ de même provenance (Ly49A^{faible}) (Michaelsson *et al.*, 2000). Or, nos clones de cellules Jurkat Ly49A^{élevé} et Ly49C^{élevé} présentent des niveaux d'expression représentatifs de ceux retrouvés chez ces souris (Table I/Article II et résultats non publiés) et pourtant aucune conséquence fonctionnelle n'est observée suite à l'engagement de ces récepteurs par la molécule H-2D^b exprimée en surface de CPA (Figures 3B, 3C et 4/Article II). De manière encore plus convaincante, une même publication rapporte que la molécule Ly49C lie les tétramères K^b et D^b et adhère aux lymphoblastes exprimant la molécule H-2K^b, mais pas à ceux exprimant la molécule H-2D^b (Hanke *et al.*, 1999). De plus, cette même étude montre que l'affinité de chacun des deux récepteurs Ly49A et Ly49G2 pour leurs ligands, n'est pas forcément en corrélation avec l'intensité des signaux qu'ils transmettent. En outre, l'emploi des tétramères n'a pas permis de démontrer de liaison entre le récepteur Ly49D et la molécule H-2D^d (Hanke *et al.*, 1999) qui est pourtant clairement établie comme étant une interaction pouvant engendrer certaines conséquences fonctionnelles (George *et al.*, 1999a; Nakamura *et al.*, 1999).

Tel que mentionné dans l'article II, il nous faut néanmoins considérer la possibilité que l'interaction entre les récepteurs Ly49A et Ly49C et la molécule du H-2D^b soit de très

faible affinité et que la limite de détection de notre système soit plus faible que celle des analyses utilisant les tétramères. En effet, l'interaction entre ces récepteurs et H-2D^b pourrait avoir une conséquence fonctionnelle dans des conditions d'activation plus faibles, par exemple lorsque l'antigène est présent à très faible concentration. De plus, le seuil de réponse d'un récepteur serait non seulement dépendant de son avidité, mais aussi du type de réponse étudié. En effet, tel que mentionné, les cascades de signalisation enclenchées par les différents récepteurs NK, menant par exemple à la synthèse de cytokines et à l'exocytose granulaire, sont différemment constituées et régulées.

Conclusion et perspectives de la partie II

Les résultats présentés dans l'Article II démontrent l'importance que peut avoir la modulation de l'avidité des récepteurs Ly49 inhibiteurs, puisqu'elle a comme conséquence de modifier l'état d'activation de la cellule qui les expriment. En effet, nous avons pu tracer une courbe de corrélation entre le niveau d'expression de Ly49A et sa capacité d'inhiber l'activation des cellules T stimulées via leur TCR. De plus, nous avons pu démontrer que l'affinité du récepteur Ly49C pour ses ligands influence de façon importante la force du signal d'inhibition qu'il peut engendrer. Finalement, puisque nos résultats suggèrent que la molécule H-2D^b ne semble pas être un ligand fonctionnel pour les récepteurs Ly49A et Ly49C, ils illustrent la nécessité d'effectuer des analyses fonctionnelles pour l'identification des ligands de ces récepteurs.

Une fois que la sensibilité de notre système sera accrue de façon à pouvoir étudier des interactions récepteur/ligand de faibles affinités, il sera possible de poursuivre la caractérisation de ces dernières et ce, tant au point de vue signalétique que structural. C'est à dire que nous pourrions notamment identifier les ligands fonctionnels d'autres récepteurs de la famille Ly49, identifier les molécules d'adhésion et de signalisation intracellulaires impliquées, identifier les affinités relatives de ces récepteurs pour leurs différents ligands, etc. Aussi, la production de récepteurs chimériques nous permettra de caractériser l'implication des différentes portions structurales des molécules Ly49

impliquées dans la reconnaissance de leurs ligands et dans la transmission de leurs signaux à l'intérieur de la cellule. Il est intéressant de noter que les signaux d'inhibition provenant des récepteurs Ly49A et Ly49G2 peuvent être cumulatifs lorsqu'ils sont exprimés à la surface d'une même cellule (Hanke et Raulet, 2001). Donc, la production de clones de cellules T co-exprimant différents récepteurs Ly49 activateurs et/ou inhibiteurs et possédant des ligands identiques ou distincts, nous permettra d'étudier la dynamique des réponses signalétiques enclenchées suite à l'engagement simultané de ces différents récepteurs.

Chacune des composantes de l'avidité peut être modulée par toute une série de variables qui elles-mêmes fluctuent selon l'état physiologique de l'hôte. Ainsi, tout comme le niveau d'expression des molécules du CMH-I, le niveau d'expression des NKR peut être modulé par la présence de cytokines (Yokoyama *et al.*, 1990; Assarsson *et al.*, 2000; Das et Saxena, 2001), par l'état d'activation de la cellule effectrice qui les expriment (Huard et Karlsson, 2000a), par la présence de micro-organismes pathogènes (Depatie *et al.*, 1999), etc. Puisque la modulation de l'avidité des récepteurs Ly49 provoque des conséquences fonctionnelles importantes et que la modulation du niveau d'expression membranaire des molécules Ly49 est un processus très rapide (Kase *et al.*, 1998), les cellules pourraient donc s'adapter de façon dynamique à l'état de leur hôte en modulant l'expression membranaire de leurs molécules Ly49. Tel qu'il a été suggéré par plusieurs équipes, la présence de récepteurs Ly49 à la surface des lymphocytes T pourrait servir de régulateur de l'intensité du signal généré via les récepteurs d'antigènes de ces cellules, plutôt que de les inhiber complètement. D'autre part, la démonstration que des souris d'haplotype H-2^d transgéniques pour l'expression de Ly49A à la surface des cellules T peuvent notamment présenter un désordre inflammatoire sévère et une capacité réduite de contrôler certaines infections, démontre l'importance biologique que la présence des récepteurs Ly49 inhibiteurs peut exercer sur les différentes fonctions des cellules T (Zajac *et al.*, 1999; Fahlen *et al.*, 2000).

PARTIE III

ÉTUDE DE LA CAPACITÉ DE RÉCEPTEURS LY49 D'INTERFÉRER AVEC CERTAINS
MÉCANISMES PERMETTANT LA SURVIE DES LYMPHOCYTES T ACTIVÉS

Le troisième volet de ce projet de recherche avait comme but de démontrer la capacité de récepteurs Ly49 d'inhiber l'AICD de cellules T activées via leur TCR. Le cas échéant, cela signifierait que les NKR peuvent effectivement moduler certains mécanismes clés de la maturation des lymphocytes T, tel le maintien de leur survie suite à une stimulation antigénique, grâce auquel la population de cellules T mémoires pourrait prendre de l'expansion.

L'engagement du récepteur Ly49A inhibe l'AICD de cellules T activées

Les résultats de l'article III, démontrent clairement que l'engagement du récepteur Ly49A, exprimé à la surface de cellules T CD4⁺ activées via leur TCR, inhibe la synthèse d'IL-2 (Figure 1/Article III) ainsi que l'AICD (Figures 2 et 3/Article III) et ce, aussi bien lorsqu'il est engagé par des AcMo (Figures 1A, 1B, 2A et 3A/Article III) que lorsqu'il interagit avec ses ligands exprimés à la surface de CPA (Figures 1C et 2B/Article III). Toutefois, pour que Ly49A puisse enclencher un signal d'inhibition perceptible, ce récepteur et le TCR doivent obligatoirement être co-agrégés (Figure 1B/Article III). Tel que suggéré pour certains récepteurs d'inhibition, ce mécanisme permettrait la spécificité de leur action ainsi que le rapprochement des différents substrats et molécules de signalisation nécessaires à leur fonction inhibitrice (Blery *et al.*, 1997).

Au moment où nous avons publié nos résultats, l'équipe de Vivier rapportait des observations similaires aux nôtres pour les récepteurs KIR (Ugolini *et al.*, 2001). Cette équipe a utilisé comme modèle, une souris transgénique pour un récepteur KIR et son ligand, dont des cellules T CD8⁺ isolées sont activées *in vitro* en présence de CPA. Les auteurs observent que la fréquence de cellules apoptotiques chute lorsque KIR interagit avec son ligand, contrairement à ce qui est observé lorsque seul le TCR est engagé. Ces résultats suggèrent une augmentation du taux de survie des cellules T CD8⁺KIR⁺ par

l'inhibition de l'AICD lorsque KIR interagit avec son ligand, ce qui est en accord avec l'accumulation de cellules T CD8⁺KIR⁺ mémoires observée dans cette souris (Ugolini *et al.*, 2001). D'ailleurs, les mêmes résultats ont été observés chez des souris exprimant comme transgène un récepteur Ly49 inhibiteur, dont le ligand était présent (Coles *et al.*, 2000; Oberg *et al.*, 2000; Pauza *et al.*, 2000). Aussi, une équipe a rapporté que l'engagement des récepteurs Ly49C et Ly49I exprimés à la surface de cellules de type B-1, peut atténuer l'inhibition de la prolifération induite par l'engagement du BCR (Ochi et Watanabe, 2000). Puisque l'engagement du BCR de ces cellules conduit normalement à l'AICD, on pourrait supposer que l'augmentation de la prolifération observée est le reflet de l'inhibition de l'AICD. Pour le confirmer, il faudrait toutefois démontrer que le nombre de cellules apoptotiques chute suite à l'engagement de ces récepteurs exprimés à la surface de cellules B activées via leur BCR. Plus récemment, il a été démontré que l'engagement de récepteurs KIR et CD94/NKG2 peut inhiber l'apoptose et la sécrétion de FasL lorsqu'ils sont exprimés à la surface de cellules NK activées par l'engagement de la molécule CD8 préalablement transfectée chez ces dernières (Spaggiari *et al.*, 2002).

Caractérisation des mécanismes pouvant être impliqués dans la régulation de l'AICD par le récepteur Ly49A

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer comment l'engagement des NKR pourrait inhiber l'AICD enclenchée par la stimulation du TCR. En effet, ces récepteurs pourraient inhiber soit la cascade de signaux provenant de l'engagement du TCR qui mène normalement à l'initiation de la transcription de FasL, soit l'expression de Fas ou de FasL directement (au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel) induite par l'engagement du TCR ou soit la cascade de signaux provenant de l'interaction Fas/FasL menant éventuellement à l'apoptose (revu par Janssen *et al.*, 2000). Nos résultats démontrent que le récepteur Ly49A puisse interférer avec l'AICD via l'inhibition sélective de la transcription de FasL, et non de Fas (Figure 4/Article III). Il reste à vérifier si cette inhibition sera reflétée par une chute proportionnelle de l'expression membranaire de FasL. L'expression de FasL à la surface des lymphocytes, contrairement à Fas, n'est pas constitutive, mais transitoire et finement régulée. L'analyse de la région promotrice de FasL a permis d'identifier

plusieurs sites de liaison pour différents facteurs de transcription. À titre d'exemple, NF-AT (Laufer *et al.*, 1988), SP1 (Xiao *et al.*, 1999), NF- κ B (Kasibhatla *et al.*, 1999) et IRF-1 (Chow *et al.*, 2000) seraient tous des régulateurs positifs de la transcription de FasL normalement induite par l'engagement du TCR (revu par Holmstrom et Eriksson, 2000), contrairement au trans-activateur du CMH-II (CIITA) qui serait un régulateur négatif (Gourley et Chang, 2001). Cependant, on ne connaît pas encore en détail les mécanismes par lesquels ces facteurs interagissent pour réguler l'initiation de la transcription de FasL suite à une stimulation antigénique.

Tel qu'attendu, l'engagement de la chimère Ly49A/H (dans laquelle le domaine cytoplasmique de Ly49A a été remplacé par celui de Ly49H qui ne possède pas d'ITIM), ne permet pas d'enclencher un signal permettant l'inhibition de la synthèse d'IL-2, de l'AICD et de la transcription de FasL chez les cellules T activées via leur TCR (Figures 1 à 4/Article III). En effet, tel que mentionné antérieurement, il a été démontré que l'ITIM du récepteur Ly49A est essentiel à la transmission de son signal d'inhibition à l'intérieur de la cellule et ce, par le biais du recrutement de SHP-1 qui peut inactiver une cascade de signaux d'activation dépendante d'une activité kinase, telle l'activité cytotoxique et la sécrétion de cytokines (revu par Anderson *et al.*, 2001). Or, il a été établi que l'engagement du TCR peut induire la transcription de FasL et son expression à la surface des cellules T activées via des cascades de signaux impliquant notamment des PTK (Anel *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 1996). On a aussi observé que SHP-1 est impliquée dans le contrôle négatif de l'AICD induite par la stimulation du TCR (Zhang *et al.*, 1999). L'ensemble de ces observations suggère que la régulation à la baisse de l'AICD par l'engagement de Ly49A pourrait donc s'effectuer par la réduction de la transcription de FasL grâce au recrutement de SHP-1 via son ITIM. Cependant, nos résultats suggèrent que l'engagement du récepteur Ly49A exprimé à la surface de l'hybridome de cellules T 1F2, ne semble pas affecter de façon significative le niveau de phosphorylation des résidus tyrosine des protéines généralement impliquées dans la cascade de signaux résultante de l'engagement du complexe TCR/CD3 (résultats non publiés). Tel que mentionné dans l'Article III, la phosphorylation par SHP-1 peut être un événement

transitoire difficile à détecter. D'autre part, il est important de mentionner qu'il est possible que l'inhibition de l'AICD via le récepteur Ly49A puisse s'effectuer autrement que par l'implication d'une PTP. En effet, il a été démontré que l'ITIM des KIR permet leur association à la phosphatidylinositol 3-kinase, ce qui engendre ultérieurement l'activation de la protéine AKT, une sérine/thréonine kinase anti-apoptotique (Marti *et al.*, 1998). Ce mécanisme pourrait donc permettre aux NKR d'interférer avec l'AICD de façon indépendante de SHP-1.

L'occurrence de certains événements correspond à la transition entre le phénotype des cellules T activées à celui des cellules T mémoires. Dans les cellules T mémoires, outre la régulation à la baisse de l'expression de FasL à la surface membranaire (Kirchhoff *et al.*, 2000), on assiste notamment à la régulation à la hausse des protéines Bcl-XL, Bcl-2 et c-FLIP (Boise *et al.*, 1995; Kirchhoff *et al.*, 2000) qui sont toutes des protéines anti-apoptotiques (Itoh *et al.*, 1993; Irmeler *et al.*, 1997). S'il s'avère que l'expression en surface de FasL n'est pas modulée par le récepteur Ly49A, la régulation d'une de ces protéines pourrait être une avenue intéressante à explorer. À ce titre, il est intéressant de noter que le récepteur OX40 exprimé à la surface de lymphocytes T CD4⁺ mémoires permet aux cellules T activées d'échapper à l'AICD (Maxwell *et al.*, 2000; Weatherill *et al.*, 2001) et ce, en induisant l'expression de Bcl-xL et Bcl-2 (Rogers *et al.*, 2001).

Conclusion et perspectives de la partie III

En résumé, nos résultats démontrent que l'engagement du récepteur Ly49A est capable d'interférer avec l'AICD induite par la stimulation du récepteur d'antigène des cellules T CD4⁺. Cette inhibition semblerait impliquer l'atténuation sélective de la transcription de FasL et non de Fas. Ces résultats suggèrent que les récepteurs d'inhibition de la famille Ly49 pourraient moduler la survie des lymphocytes T activés.

Pendant nos travaux, plusieurs équipes ont confirmé la présence de cellules T CD8⁺NKR⁺ mémoires spécifiques d'antigènes tumoraux (Huard et Karlsson, 2000b; Peacock *et al.*,

2000), viraux (Kambayashi *et al.*, 2000; Peacock *et al.*, 2000) et autologues (Fahlen *et al.*, 2000; Huard et Karlsson, 2000b) et ce, tant chez des sujets sains que chez des sujets atteints de certaines pathologies. Ces observations suggèrent que les lymphocytes T NKR⁺ pourraient être des cibles thérapeutiques de choix pour le traitement de certaines pathologies. Par exemple, par leur capacité d'augmenter le nombre de cellules T mémoires (par l'inhibition de l'AICD), la stimulation de l'expression des NKR à la surface de ces cellules pourrait être bénéfique afin d'accroître l'efficacité de vaccins antitumoraux ou antiviraux. Par contre, la modulation à la baisse de leur niveau d'expression à la surface de cellules T mémoires spécifiques d'antigènes du soi dont le nombre serait ainsi limité, pourrait être mise à profit dans le cadre de thérapies visant des pathologies auto-immunes. Par conséquent, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation, la régulation et l'interruption de l'AICD par ce type de récepteur, est d'autant plus importante.

Puisque l'engagement de récepteur Ly49 à la surface de cellules T hausse le seuil de réponse du TCR (Oberg *et al.*, 2000; Pauza *et al.*, 2000), que la capacité inhibitrice des récepteurs Ly49 est proportionnelle à leur niveau d'expression (Article II) qui est d'ailleurs inductible et qui peut être modulé selon l'état d'activation de ces cellules (Huard et Karlsson, 2000b), le rôle de ces récepteurs pourrait donc être de réguler la signalisation issue de l'engagement du TCR en modulant son seuil de réponse plutôt que d'être de simples interrupteurs "marche/arrêt". Donc, dans le contexte de l'utilisation thérapeutique de la modulation de l'expression des NKR à la surface de cellules T activées, il serait important d'étudier comment l'avidité de ces récepteurs peut moduler leur capacité à interférer avec l'AICD. Cette question pourrait être abordée par l'obtention de clones de l'hybridome 1F2 exprimant différents niveaux du récepteur Ly49A. Finalement, le modèle d'étude développé lors de ce projet pourra aussi évidemment servir à identifier les protéines de signalisation membranaires et cytoplasmiques à la base du(des) mécanisme(s) qu'utilisent les NKR inhibiteurs pour moduler l'AICD.

Conclusion Générale

L'observation que les récepteurs Ly49 inhibiteurs se retrouvent sur plusieurs types de cellules et qu'ils régulent différents types de fonctions, suggère qu'ils ont un rôle important à jouer dans le système immunitaire. En fait, la présence de récepteurs Ly49 inhibiteurs semblerait être en quelque sorte un couteau à deux tranchants : elle pourrait être à la fois dommageable ou bénéfique pour la cellule qui les exprime. En effet, tel que proposé, la présence de ces récepteurs pourrait permettre à celle-ci de déceler sur les cellules environnantes les altérations des molécules du CMH-I tout en évitant le développement d'une réaction auto-immunitaire. De plus, l'engagement de récepteurs Ly49 inhibiteurs à la surface de cellules T activées permettrait l'augmentation de leur taux de survie suite à une stimulation antigénique et pourrait ainsi augmenter l'efficacité du système immunitaire en augmentant le pool de cellules T mémoires. Cependant, les micro-organismes pathogènes pourraient tirer profit des récepteurs Ly49 inhibiteurs pour berner les cellules qui les expriment afin d'échapper à la surveillance immunitaire et ce, via la synthèse d'homologues du CMH-I exprimés à la surface des cellules infectées, par exemple. D'autre part, en augmentant le seuil de réponse du TCR, ces récepteurs pourraient empêcher les cellules T autoréactives périphériques d'être éliminées, augmentant ainsi la probabilité qu'une réponse auto-immune puisse se développer (Anderton et Wraith, 2002), par exemple lorsque leur expression est "anormale", situation notamment retrouvée chez les souris transgéniques.

Étant donné l'importance des conséquences fonctionnelles associées aux variations de l'avidité des récepteurs Ly49, la modulation de leur niveau d'expression par exemple, pourrait donc permettre aux cellules de s'adapter rapidement aux fluctuations de leur micro-environnement (composition en cytokines, par exemple). Toutefois, un dérèglement du niveau d'expression de ces récepteurs pourrait être néfaste pour la cellule qui l'exprime. Rappelons l'exemple des souris exprimant à la surface de leurs cellules T un récepteur Ly49 inhibiteur comme transgène dont le ligand est présent et chez qui un haut niveau d'expression du récepteur semblerait être responsable du développement de pathologies associées au dérèglement de la réponse immune. Malgré que ce haut niveau d'expression ne soit pas physiologiquement représentatif, il illustre bien l'importance de

bien comprendre les liens entre les cascades de signaux activateurs/inhibiteurs des récepteurs Ly49 ainsi que les différents paramètres qui déterminent leur intensité selon la fonction étudiée et selon le contexte physiopathologique dans lequel la cellule se retrouve.

Les résultats rapportés dans cette thèse contribuent à l'avancement des connaissances sur les mécanismes impliqués dans la régulation de la capacité de signalisation des récepteurs Ly49 inhibiteurs, sur les fonctions cellulaires qu'ils régulent ainsi que sur l'activité biologique des cellules qui les expriment. Dans un cadre plus large, il ne faut pas oublier que les récepteurs d'inhibition de la famille Ly49 font partie d'un groupe de familles de NKR pouvant être co-exprimés sur une même cellule et dont l'engagement par les molécules du CMH-I conduit à l'inhibition de l'activation des programmes de cytotoxicité cellulaire et de sécrétion de cytokines via une propriété structurale commune : la possession d'un ITIM dans leur portion cytoplasmique. Donc, les résultats que nous avons obtenus abondent dans le même sens que les observations récemment rapportées dans la littérature et qui dans l'ensemble, suggèrent que ce type de récepteurs soit impliqué dans la régulation de toute une panoplie de mécanismes et fonctions cellulaires ayant un impact majeur sur le développement et l'homéostasie du système immunitaire, puisque des NKR sont exprimés à la surface de cellules myéloïdes, lymphoïdes et dendritiques. Il sera donc essentiel de déterminer la contribution de chacun de ces récepteurs et les voies d'activation et d'inhibition qu'ils utilisent, leur importance relative dans différents contextes et leur interaction potentielle, afin de pouvoir dresser le tableau complet de ce qui régule l'état d'activation des cellules qui expriment ces récepteurs.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Suzanne Lemieux pour m'avoir dirigée, offert un projet de doctorat des plus stimulant et enseigné la rigueur, et ce, à tous les niveaux scientifiques.

Je suis également très reconnaissante envers le Dr Pascale Duplay pour la confiance qu'elle m'a toujours témoignée et ce, dès le début de nos travaux. Elle m'a enseigné le sens critique et le développement d'un projet de recherche, de la conception de son idée maîtresse jusqu'à sa validation.

Je m'en voudrais de ne pas mentionner le Dr Michel Trudel qui m'a appuyé depuis mes tous débuts en recherche; ce fut un mentor tout au long de ces 8 années d'études graduées à l'institut.

Merci aux Dr Silvia Vidal et Dr Chantal Depatie avec qui j'ai fait mes premiers pas au sein de collaborations scientifiques. Merci à Yvette Lusignan pour son support technique et pour les excellentes discussions scientifiques plus que stimulantes. Merci à Joanne Roger pour la merveilleuse équipe que nous avons formée, mais surtout pour son amitié, sa générosité et son écoute.

Je voudrais aussi remercier certains collègues qui au cours des années ont teinté ma vie : Valérie, Monica, Nadia, Pierre, Eva, Claire, Jean-Guy, Benoît, Mikhail, Annie, Karine, le comité organisateur du congrès interne, Maryse, Anna-Karine et Geneviève. J'espère que nous saurons encore bien longtemps partager nos passions. Merci à tous les autres étudiants et membres du personnel, qui ont croisé mon chemin et qui ont rendu mon séjour dans cet institut si agréable et si enrichissant. Un clin d'œil à Marcel Desrosiers pour son expertise et son aide en cytométrie en flux, qui a été une technique essentielle pour mes différents projets de recherche.

Et comment oublier ma famille qui a su être présente à chacune des étapes, surtout les plus difficiles et qui m'a ainsi permis à maintes fois de me dépasser. Merci de tout coeur à Jean, Micheline, Marie-Claude, François et Olivier. Merci aussi à Jean-Patrick qui, tout au long de mes 11 années d'études universitaires, m'a accompagnée au quotidien avec tout ce que ça implique comme sacrifices et concessions. Grâce à lui j'ai su découvrir et entretenir les différentes passions qui meublent ma vie. Clin d'œil à Ariane.

Finalement, je remercie le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, les Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, la Fondation Armand-Frappier ainsi que Laval Technopole pour les appuis financiers qu'ils m'ont octroyés.

RÉFÉRENCES

- Anderson S. K., Ortaldo J. R. et McVicar D. W. (2001) The ever-expanding Ly49 gene family: repertoire and signaling. *Immunol Rev* **181**, 79-89.
- Andersson M., Frelund S., Johansson M. H., Wallin R., Sandberg J. K., Chambers B. J., Christensson B., Lendahl U., Lemieux S., Salcedo M. et Ljunggren H. G. (1998) MHC class I mosaic mice reveal insights into control of Ly49C inhibitory receptor expression in NK cells. *J Immunol* **161**, 6475-9.
- Anderton S. M. et Wraith D. C. (2002) Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* **2**, 487-98.
- Andre P., Brunet C., Guia S., Gallais H., Sampol J., Vivier E. et Dignat-George F. (1999) Differential regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. *Eur J Immunol* **29**, 1076-85.
- Anel A., Buferne M., Boyer C., Schmitt-Verhulst A. M. et Golstein P. (1994) T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur J Immunol* **24**, 2469-76.
- Arase H., Arase N. et Saito T. (1996) Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J Exp Med* **183**, 2391-6.
- Arase H., Mocarski E. S., Campbell A. E., Hill A. B. et Lanier L. L. (2002) Direct Recognition of Cytomegalovirus by Activating and Inhibitory NK Cell Receptors. *Science* **11**, 11.
- Arase N., Arase H., Park S. Y., Ohno H., Ra C. et Saito T. (1997) Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *J Exp Med* **186**, 1957-63.
- Arnon T. I., Lev M., Katz G., Chernobrov Y., Porgador A. et Mandelboim O. (2001) Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* **31**, 2680-9.

- Ashton-Rickardt P. G. et Tonegawa S. (1994) A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol Today* **15**, 362-6.
- Assarsson E., Kambayashi T., Sandberg J. K., Hong S., Taniguchi M., Van Kaer L., Ljunggren H. G. et Chambers B. J. (2000) CD8⁺ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* **165**, 3673-9.
- Bancroft G. J., Shellam G. R. et Chalmer J. E. (1981) Genetic influences on the augmentation of natural killer (NK) cells during murine cytomegalovirus infection: correlation with patterns of resistance. *J Immunol* **126**, 988-94.
- Barten R., Torkar M., Haude A., Trowsdale J. et Wilson M. J. (2001) Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol* **22**, 52-7.
- Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J. H., Lanier L. L. et Spies T. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727-9.
- Beck S. et Barrell B. G. (1988) Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* **331**, 269-72.
- Behar S. M. et Cardell S. (2000) Diverse CD1d-restricted T cells: diverse phenotypes, and diverse functions. *Semin Immunol* **12**, 551-60.
- Bendelac A., Killeen N., Littman D. R. et Schwartz R. H. (1994) A subset of CD4⁺ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* **263**, 1774-8.
- Bendelac A. (1995) CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *Science* **269**, 185-6.
- Bendelac A., Rivera M. N., Park S. H. et Roark J. H. (1997) Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 535-62.
- Benlagha K., Weiss A., Beavis A., Teyton L. et Bendelac A. (2000) *In vivo* identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med* **191**, 1895-903.
- Bennett M. (1987) Biology and genetics of hybrid resistance. *Adv Immunol* **41**, 333-445.

- Bennett M., Kumar V., Mikhael A., Murphy W. J., Rembecki R. M., Sentman C. L. et David C. S. (1987) Rejection of bone marrow cells by irradiated mice: NK and T cells recognize different antigens. *Transplant Proc* **19**, 5-11.
- Bertone S., Schiavetti F., Bellomo R., Vitale C., Ponte M., Moretta L. et Mingari M. C. (1999) Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **29**, 23-9.
- Biassoni R., Pessino A., Malaspina A., Cantoni C., Bottino C., Sivori S., Moretta L. et Moretta A. (1997) Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol* **27**, 3095-9.
- Biassoni R., Cantoni C., Pende D., Sivori S., Parolini S., Vitale M., Bottino C. et Moretta A. (2001) Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev* **181**, 203-14.
- Binstadt B. A., Brumbaugh K. M., Dick C. J., Scharenberg A. M., Williams B. L., Colonna M., Lanier L. L., Kinet J. P., Abraham R. T. et Leibson P. J. (1996) Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* **5**, 629-38.
- Biron C. A., Byron K. S. et Sullivan J. L. (1989) Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* **320**, 1731-5.
- Biron C. A., Nguyen K. B., Pien G. C., Cousens L. P. et Salazar-Mather T. P. (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* **17**, 189-220.
- Bix M., Liao N. S., Zijlstra M., Loring J., Jaenisch R. et Raulet D. (1991) Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* **349**, 329-31.
- Bix M. et Locksley R. M. (1995) Natural T cells. Cells that co-express NKRP-1 and TCR. *J Immunol* **155**, 1020-2.
- Blaser C., Kaufmann M. et Pircher H. (1998) Virus-activated CD8 T cells and lymphokine-activated NK cells express the mast cell function-associated antigen, an inhibitory C-type lectin. *J Immunol* **161**, 6451-4.

- Blery M., Delon J., Trautmann A., Cambiaggi A., Olcese L., Biassoni R., Moretta L., Chavrier P., Moretta A., Daeron M. et Vivier E. (1997) Reconstituted killer cell inhibitory receptors for major histocompatibility complex class I molecules control mast cell activation induced via immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *J Biol Chem* **272**, 8989-96.
- Blery M., Olcese L. et Vivier E. (2000) Early signaling via inhibitory and activating NK receptors. *Hum Immunol* **61**, 51-64.
- Boise L. H., Minn A. J., Noel P. J., June C. H., Accavitti M. A., Lindsten T. et Thompson C. B. (1995) CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**, 87-98.
- Bonavida B., Katz J. et Gottlieb M. (1986) Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. I. Defective trigger on NK cells for NKCF production by target cells, and partial restoration by IL 2. *J Immunol* **137**, 1157-63.
- Bonnema J. D., Karnitz L. M., Schoon R. A., Abraham R.T. et Leibson P. J. (1994) Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in natural killer cells is associated with protein kinase C-independent granule release and cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* **180**, 1427-35.
- Borges L., Hsu M. L., Fanger N., Kubin M. et Cosman D. (1997) A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol* **159**, 5192-6.
- Borthwick N. J., Bofill M., Hassan I., Panayiotidis P., Janossy G., Salmon M. et Akbar A. N. (1996) Factors that influence activated CD8+ T-cell apoptosis in patients with acute herpesvirus infections: loss of costimulatory molecules CD28, CD5 and CD6 but relative maintenance of Bax and Bcl-X expression. *Immunology* **88**, 508-15.
- Braud V. M., Allan D. S., O'Callaghan C. A., Soderstrom K., D'Andrea A., Ogg G. S., Lazetic S., Young N. T., Bell J. I., Phillips J. H., Lanier L. L. et McMichael A. J. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**, 795-9.

- Brawand P., Lemonnier F. A., MacDonald H. R., Cerottini J. C. et Held W. (2000) Transgenic expression of Ly49A on T cells impairs a specific antitumor response. *J Immunol* **165**, 1871-6.
- Brennan J., Mager D., Jefferies W. et Takei F. (1994) Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties. *J Exp Med* **180**, 2287-95.
- Brennan J., Takei F., Wong S. et Mager D. L. (1995) Carbohydrate recognition by a natural killer cell receptor, Ly-49C. *J Biol Chem* **270**, 9691-4.
- Brennan J., Lemieux S., Freeman J. D., Mager D. L. et Takei F. (1996) Heterogeneity among Ly-49C natural killer (NK) cells: characterization of highly related receptors with differing functions and expression patterns. *J Exp Med* **184**, 2085-90.
- Brooks A. G., Borrego F., Posch P. E., Patamawenu A., Scorzelli C. J., Ulbrecht M., Weiss E. H. et Coligan J. E. (1999) Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. *J Immunol* **162**, 305-13.
- Brown M. G., Fulmek S., Matsumoto K., Cho R., Lyons P. A., Levy E. R., Scalzo A. A. et Yokoyama W. M. (1997a) A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6. *Genomics* **42**, 16-25.
- Brown M. G., Scalzo A. A., Matsumoto K. et Yokoyama W. M. (1997b) The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* **155**, 53-65.
- Brown M. G., Zhang J., Du Y., Stoll J., Yokoyama W. M. et Scalzo A. A. (1999) Localization on a physical map of the NKC-linked *Cmv1* locus between Ly49b and the Prp gene cluster on mouse chromosome 6. *J Immunol* **163**, 1991-9.
- Brown M. G., Dokun A. O., Heusel J. W., Smith H. R., Beckman D. L., Blattenberger E. A., Dubbelde C. E., Stone L. R., Scalzo A. A. et Yokoyama W. M. (2001a) Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* **292**, 934-7.

- Brown M. G., Scalzo A. A., Stone L. R., Clark P. Y., Du Y., Palanca B. et Yokoyama W. M. (2001b) Natural killer gene complex (Nkc) allelic variability in inbred mice: evidence for Nkc haplotypes. *Immunogenetics* **53**, 584-91.
- Brown M. H., Boles K., van der Merwe P. A., Kumar V., Mathew P. A. et Barclay A. N. (1998) 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med* **188**, 2083-90.
- Brumbaugh K. M., Binstadt B. A. et Leibson P. J. (1998) Signal transduction during NK cell activation: balancing opposing forces. *Curr Top Microbiol Immunol* **230**, 103-22.
- Brunner T., Yoo N. J., LaFace D., Ware C. F. et Green D. R. (1996) Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas. Differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506. *Int Immunol* **8**, 1017-26.
- Bukowski J. F., Woda B. A. et Welsh R. M. (1984) Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J Virol* **52**, 119-28.
- Bukowski J. F., Warner J. F., Dennert G. et Welsh R. M. (1985) Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells *in vivo*. *J Exp Med* **161**, 40-52.
- Bukowski J. F., Yang H. et Welsh R. M. (1988) Antiviral effect of lymphokine-activated killer cells: characterization of effector cells mediating prophylaxis. *J Virol* **62**, 3642-8.
- Burshtyn D. N., Scharenberg A. M., Wagtmann N., Rajagopalan S., Berrada K., Yi T., Kinet J. P. et Long E. O. (1996) Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* **4**, 77-85.
- Campbell A. E. et Slater J. S. (1994) Down-regulation of major histocompatibility complex class I synthesis by murine cytomegalovirus early gene expression. *J Virol* **68**, 1805-11.
- Carena I., Shamshiev A., Donda A., Colonna M. et Libero G. D. (1997) Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and

- early signaling of T cell antigen receptor-gamma/delta stimulated by nonpeptidic ligands. *J Exp Med* **186**, 1769-74.
- Carlyle J. R., Martin A., Mehra A., Attisano L., Tsui F. W. et Zuniga-Pflucker J. C. (1999) Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function. *J Immunol* **162**, 5917-23.
- Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S. H., Beavis A., Koezuka Y. et Bendelac A. (1999) Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* **163**, 4647-50.
- Cerboni C., Mousavi-Jazi M., Wakiguchi H., Carbone E., Karre K. et Soderstrom K. (2001) Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* **31**, 2926-35.
- Cerwenka A., Bakker A. B., McClanahan T., Wagner J., Wu J., Phillips J. H. et Lanier L. L. (2000) Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* **12**, 721-7.
- Chan P. Y. et Takei F. (1986) Expression of a T cell receptor-like molecule on normal and malignant murine T cells detected by rat monoclonal antibodies to nonclonotypic determinants. *J Immunol* **136**, 1346-53.
- Chang C. S. et Kane K. P. (1998) Evidence for sulfate modification of H-2Dd on N-linked carbohydrate(s): possible involvement in Ly-49A interaction. *J Immunol* **160**, 4367-74.
- Chiu Y. H., Jayawardena J., Weiss A., Lee D., Park S. H., Dautry-Varsat A. et Bendelac A. (1999) Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med* **189**, 103-10.
- Chow W. A., Fang J. J. et Yee J. K. (2000) The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. *J Immunol* **164**, 3512-8.
- Chung D. H., Dorfman J., Plaksin D., Natarajan K., Belyakov I. M., Hunziker R., Berzofsky J. A., Yokoyama W. M., Mage M. G. et Margulies D. H. (1999) NK and CTL recognition of a single chain H-2Dd molecule: distinct sites of H-2Dd interact with NK and TCR. *J Immunol* **163**, 3699-708.

- Chung D. H., Natarajan K., Boyd L. F., Tormo J., Mariuzza R. A., Yokoyama W. M. et Margulies D. H. (2000) Mapping the ligand of the NK inhibitory receptor Ly49A on living cells. *J Immunol* **165**, 6922-32.
- Cohen G. B., Gandhi R. T., Davis D. M., Mandelboim O., Chen B. K., Strominger J. L. et Baltimore D. (1999) The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **10**, 661-71.
- Cohen J. I. et Corey G. R. (1985) Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine (Baltimore)* **64**, 100-14.
- Coles M. C., McMahon C. W., Takizawa H. et Raulet D. H. (2000) Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors. *Eur J Immunol* **30**, 236-44.
- Correa I. et Raulet D. H. (1995) Binding of diverse peptides to MHC class I molecules inhibits target cell lysis by activated natural killer cells. *Immunity* **2**, 61-71.
- Cosman D., Fanger N., Borges L., Kubin M., Chin W., Peterson L. et Hsu M. L. (1997) A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* **7**, 273-82.
- Cosman D., Fanger N. et Borges L. (1999) Human cytomegalovirus, MHC class I and inhibitory signalling receptors: more questions than answers. *Immunol Rev* **168**, 177-85.
- Cosman D., Mullberg J., Sutherland C. L., Chin W., Armitage R., Fanslow W., Kubin M. et Chalupny N. J. (2001) ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**, 123-33.
- Cretney E., Degli-Esposti M. A., Densley E. H., Farrell H. E., Davis-Poynter N. J. et Smyth M. J. (1999) m144, a murine cytomegalovirus (MCMV)-encoded major histocompatibility complex class I homologue, confers tumor resistance to natural killer cell-mediated rejection. *J Exp Med* **190**, 435-44.

- Cudkowicz G. et Bennett M. (1971) Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. II. Rejection of parental grafts by resistant F 1 hybrid mice. *J Exp Med* **134**, 1513-28.
- Cui J., Shin T., Kawano T., Sato H., Kondo E., Toura I., Kaneko Y., Koseki H., Kanno M. et Taniguchi M. (1997) Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* **278**, 1623-6.
- D'Ambrosio D., Hippen K. L., Minskoff S. A., Mellman I., Pani G., Siminovitch K. A. et Cambier J. C. (1995) Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1. *Science* **268**, 293-7.
- Daniel C., Grakoui A. et Allen P. M. (1998) Inhibition of an *in vitro* CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J Immunol* **160**, 3244-50.
- Daniels B. F., Karlhofer F. M., Seaman W. E. et Yokoyama W. M. (1994a) A natural killer cell receptor specific for a major histocompatibility complex class I molecule. *J Exp Med* **180**, 687-92.
- Daniels B. F., Nakamura M. C., Rosen S. D., Yokoyama W. M. et Seaman W. E. (1994b) Ly-49A, a receptor for H-2Dd, has a functional carbohydrate recognition domain. *Immunity* **1**, 785-92.
- Daniels K. A., Devora G., Lai W. C., O'Donnell C. L., Bennett M. et Welsh R. M. (2001) Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J Exp Med* **194**, 29-44.
- Das A. et Saxena R. K. (2001) Abrogation of tumor induced Ly49 expression on mouse spleen cells by mitomycin C. *Immunol Lett* **77**, 73-7.
- Davis-Poynter N. J., Degli-Esposti M. et Farrell H. E. (1999) Murine cytomegalovirus homologues of cellular immunomodulatory genes. *Intervirology* **42**, 331-41.
- Delano M. L. et Brownstein D. G. (1995) Innate resistance to lethal mousepox is genetically linked to the NK gene complex on chromosome 6 and correlates with early restriction of virus replication by cells with an NK phenotype. *J Virol* **69**, 5875-7.
- Depatie C., Muise E., Lepage P., Gros P. et Vidal S. M. (1997) High-resolution linkage map in the proximity of the host resistance locus *Cmv1*. *Genomics* **39**, 154-63.

- Depatie C., Chalifour A., Pare C., Lee S. H., Vidal S. M. et Lemieux S. (1999) Assessment of *Cmv1* candidates by genetic mapping and *in vivo* antibody depletion of NK cell subsets. *Int Immunol* **11**, 1541-51.
- Depatie C., Lee S. H., Stafford A., Avner P., Belouchi A., Gros P. et Vidal S. M. (2000) Sequence-ready BAC contig, physical, and transcriptional map of a 2-Mb region overlapping the mouse chromosome 6 host-resistance locus *Cmv1*. *Genomics* **66**, 161-74.
- Diefenbach A., Jamieson A. M., Liu S. D., Shastri N. et Raulet D. H. (2000) Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* **1**, 119-26.
- Dokun A. O., Chu D. T., Yang L., Bendelac A. S. et Yokoyama W. M. (2001a) Analysis of *in situ* NK cell responses during viral infection. *J Immunol* **167**, 5286-93.
- Dokun A. O., Kim S., Smith H. R., Kang H. S., Chu D. T. et Yokoyama W. M. (2001b) Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* **2**, 951-6.
- Dorfman J. R. et Raulet D. H. (1996) Major histocompatibility complex genes determine natural killer cell tolerance. *Eur J Immunol* **26**, 151-5.
- Dorfman J. R., Zerrahn J., Coles M. C. et Raulet D. H. (1997) The basis for self-tolerance of natural killer cells in beta2-microglobulin- and TAP-1- mice. *J Immunol* **159**, 5219-25.
- Dorfman J. R. et Raulet D. H. (1998) Acquisition of Ly49 receptor expression by developing natural killer cells. *J Exp Med* **187**, 609-18.
- Drickamer K. et Taylor M. E. (1993) Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol* **9**, 237-64.
- Eberl G., Lees R., Lowin-Kropf B. et MacDonald H. R. (1999a) Cutting edge : NKT cell development is selectively impaired in Fyn-deficient mice. *J Immunol* **163**, 4091-4.
- Eberl G., Lees R., Smiley S. T., Taniguchi M., Grusby M. J. et MacDonald H. R. (1999b) Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol* **162**, 6410-9.

- Eberl G., Brawand P. et MacDonald H. R. (2000) Selective bystander proliferation of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells upon NK T or T cell activation. *J Immunol* **165**, 4305-11.
- Eberl G. et MacDonald H. R. (2000) Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur J Immunol* **30**, 985-92.
- Emoto M., Zerrahn J., Miyamoto M., Perarnau B. et Kaufmann S. H. (2000) Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells. *Eur J Immunol* **30**, 2300-11.
- Eriksson M., Leitz G., Fallman E., Axner O., Ryan J. C., Nakamura M. C. et Sentman C. L. (1999a) Inhibitory receptors alter natural killer cell interactions with target cells yet allow simultaneous killing of susceptible targets. *J Exp Med* **190**, 1005-12.
- Eriksson M., Ryan J. C., Nakamura M. C. et Sentman C. L. (1999b) Ly49A inhibitory receptors redistribute on natural killer cells during target cell interaction. *Immunology* **97**, 341-7.
- Fahlen L., Khoo N. K., Daws M. R. et Sentman C. L. (1997) Location-specific regulation of transgenic Ly49A receptors by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur J Immunol* **27**, 2057-65.
- Fahlen L., Oberg L., Brannstrom T., Khoo N. K., Lendahl U. et Sentman C. L. (2000) Ly49A expression on T cells alters T cell selection. *Int Immunol* **12**, 215-22.
- Fahlen L., Lendahl U. et Sentman C. L. (2001) MHC class I-Ly49 interactions shape the Ly49 repertoire on murine NK cells. *J Immunol* **166**, 6585-92.
- Fahnestock M. L., Johnson J. L., Feldman R. M., Neveu J. M., Lane W. S. et Bjorkman P. J. (1995) The MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds endogenous peptides. *Immunity* **3**, 583-90.
- Fanger N. A., Cosman D., Peterson L., Braddy S. C., Maliszewski C. R. et Borges L. (1998) The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol* **28**, 3423-34.
- Farrell H. E., Vally H., Lynch D. M., Fleming P., Shellam G. R., Scalzo A. A. et Davis-Poynter N. J. (1997) Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue *in vivo*. *Nature* **386**, 510-4.

- Farrell H. E. et Davis-Poynter N. J. (1998) From sabotage to camouflage: viral evasion of cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell-mediated immunity. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 369-78.
- Fernandez N. C., Lozier A., Flament C., Ricciardi-Castagnoli P., Bellet D., Suter M., Perricaudet M., Tursz T., Maraskovsky E. et Zitvogel L. (1999) Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses *in vivo*. *Nat Med* **5**, 405-11.
- Ferrini S., Cambiaggi A., Meazza R., Sforzini S., Marciano S., Mingari M. C. et Moretta L. (1994) T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function. *Eur J Immunol* **24**, 2294-8.
- Forbes C. A., Brown M. G., Cho R., Shellam G. R., Yokoyama W. M. et Scalzo A. A. (1997) The *Cmv1* host resistance locus is closely linked to the Ly49 multigene family within the natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6. *Genomics* **41**, 406-13.
- Franksson L., Sundback J., Achour A., Bernlind J., Glas R. et Karre K. (1999) Peptide dependency and selectivity of the NK cell inhibitory receptor Ly-49C. *Eur J Immunol* **29**, 2748-58.
- Gapin L., Matsuda J. L., Surh C. D. et Kronenberg M. (2001) NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* **2**, 971-8.
- Garrido F., Ruiz-Cabello F., Cabrera T., Perez-Villar J. J., Lopez-Botet M., Duggan-Keen M. et Stern P. L. (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* **18**, 89-95.
- George T. C., Mason L. H., Ortaldo J. R., Kumar V. et Bennett M. (1999a) Positive recognition of MHC class I molecules by the Ly49D receptor of murine NK cells. *J Immunol* **162**, 2035-43.
- George T. C., Ortaldo J. R., Lemieux S., Kumar V. et Bennett M. (1999b) Tolerance and alloreactivity of the Ly49D subset of murine NK cells. *J Immunol* **163**, 1859-67.

- Godfrey D. I., Purton J. F., Boyd R. L. et Cole T. J. (2000) Stress-free T-cell development: glucocorticoids are not obligatory. *Immunol Today* **21**, 606-11.
- Gombert J. M., Herbelin A., Tancrede-Bohin E., Dy M., Carnaud C. et Bach J. F. (1996) Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* **26**, 2989-98.
- Gonzalez-Aseguinolaza G., de Oliveira C., Tomaska M., Hong S., Bruna-Romero O., Nakayama T., Taniguchi M., Bendelac A., Van Kaer L., Koezuka Y. et Tsuji M. (2000) α -galactosylceramide-activated α 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8461-6.
- Gonzalez-Aseguinolaza G., Van Kaer L., Bergmann C. C., Wilson J. M., Schmiege J., Kronenberg M., Nakayama T., Taniguchi M., Koezuka Y. et Tsuji M. (2002) Natural killer T cell ligand α -galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J Exp Med* **195**, 617-24.
- Gosselin P., Lusignan Y., Brennan J., Takei F. et Lemieux S. (1997) The NK2.1 receptor is encoded by Ly-49C and its expression is regulated by MHC class I alleles. *Int Immunol* **9**, 533-40.
- Gosselin P., Mason L. H., Willette-Brown J., Ortaldo J. R., McVicar D. W. et Anderson S. K. (1999) Induction of DAP12 phosphorylation, calcium mobilization, and cytokine secretion by Ly49H. *J Leukoc Biol* **66**, 165-71.
- Gourley T. S. et Chang C. H. (2001) Cutting edge: the class II transactivator prevents activation-induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression. *J Immunol* **166**, 2917-21.
- Groh V., Bahram S., Bauer S., Herman A., Beauchamp M. et Spies T. (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 12445-50.
- Groh V., Rhinehart R., Randolph-Habecker J., Topp M. S., Riddell S. R. et Spies T. (2001) Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* **2**, 255-60.

- Gumperz J. E., Roy C., Makowska A., Lum D., Sugita M., Podrebarac T., Koezuka Y., Porcelli S. A., Cardell S., Brenner M. B. et Behar S. M. (2000) Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* **12**, 211-21.
- Gumperz J. E. et Brenner M. B. (2001) CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol* **13**, 471-8.
- Haliotis T., Roder J., Klein M., Ortaldo J., Fauci A. S. et Herberman R. B. (1980) Chediak-Higashi gene in humans I. Impairment of natural-killer function. *J Exp Med* **151**, 1039-48.
- Hammond K. J., Poulton L. D., Palmisano L. J., Silveira P. A., Godfrey D. I. et Baxter A. G. (1998) alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* **187**, 1047-56.
- Hammond K. J., Pellicci D. G., Poulton L. D., Naidenko O. V., Scalzo A. A., Baxter A. G. et Godfrey D. I. (2001) CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J Immunol* **167**, 1164-73.
- Hanke T., Takizawa H., McMahon C. W., Busch D. H., Pamer E. G., Miller J. D., Altman J. D., Liu Y., Cado D., Lemonnier F. A., Bjorkman P. J. et Raulet D. H. (1999) Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity* **11**, 67-77.
- Hanke T. et Raulet D. H. (2001) Cumulative inhibition of NK cells and T cells resulting from engagement of multiple inhibitory Ly49 receptors. *J Immunol* **166**, 3002-7.
- Hatada M. H., Lu X., Laird E. R., Green J., Morgenstern J. P., Lou M., Marr C. S., Phillips T. B., Ram M. K., Theriault K. et al. (1995) Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* **377**, 32-8.
- Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H., Van Kaer L., Saiki I. et Okumura K. (2001) Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J Immunol* **166**, 6012-8.
- Held W., Cado D. et Raulet D. H. (1996a) Transgenic expression of the Ly49A natural killer cell receptor confers class I major histocompatibility complex (MHC)-

- specific inhibition and prevents bone marrow allograft rejection. *J Exp Med* **184**, 2037-41.
- Held W., Dorfman J. R., Wu M. F. et Raulet D. H. (1996b) Major histocompatibility complex class I-dependent skewing of the natural killer cell Ly49 receptor repertoire. *Eur J Immunol* **26**, 2286-92.
- Held W. et Raulet D. H. (1997) Ly49A transgenic mice provide evidence for a major histocompatibility complex-dependent education process in natural killer cell development. *J Exp Med* **185**, 2079-88.
- Hengel H., Brune W. et Koszinowski U. H. (1998) Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* **6**, 190-7.
- Hengel H., Reusch U., Gutermann A., Ziegler H., Jonjic S., Lucin P. et Koszinowski U. H. (1999) Cytomegaloviral control of MHC class I function in the mouse. *Immunol Rev* **168**, 167-76.
- Herberman R. B., Nunn M. E., Holden H. T. et Lavrin D. H. (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* **16**, 230-9.
- Hofer E., Sobanov Y., Brostjan C., Lehrach H. et Duchler M. (2001) The centromeric part of the human natural killer (NK) receptor complex: lectin-like receptor genes expressed in NK, dendritic and endothelial cells. *Immunol Rev* **181**, 5-19.
- Hoglund P., Ohlen C., Carbone E., Franksson L., Ljunggren H. G., Latour A., Koller B. et Karre K. (1991) Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 10332-6.
- Hoglund P., Sundback J., Olsson-Alheim M. Y., Johansson M., Salcedo M., Ohlen C., Ljunggren H. G., Sentman C. L. et Karre K. (1997) Host MHC class I gene control of NK-cell specificity in the mouse. *Immunol Rev* **155**, 11-28.
- Hoglund P., Glas R., Menard C., Kase A., Johansson M. H., Franksson L., Lemmonier F. et Karre K. (1998) Beta2-microglobulin-deficient NK cells show increased sensitivity to MHC class I-mediated inhibition, but self tolerance does not depend

- upon target cell expression of H-2Kb and Db heavy chains. *Eur J Immunol* **28**, 370-8.
- Holmstrom T. H. et Eriksson J. E. (2000) Phosphorylation-Based signaling in Fas receptor-mediated apoptosis. *Crit Rev Immunol* **20**, 121-52.
- Hong S., Wilson M. T., Serizawa I., Wu L., Singh N., Naidenko O. V., Miura T., Haba T., Scherer D. C., Wei J., Kronenberg M., Koezuka Y. et Van Kaer L. (2001) The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* **7**, 1052-6.
- Hoyle C., Bangs C. D., Chang P., Kamel O., Mehta B. et Negrin R. S. (1998) Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3(+)CD56(+) cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: *in vitro* and *in vivo* efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice. *Blood* **92**, 3318-27.
- Huard B. et Karlsson L. (2000a) KIR expression on self-reactive CD8+ T cells is controlled by T-cell receptor engagement. *Nature* **403**, 325-8.
- Huard B. et Karlsson L. (2000b) A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance. *Eur J Immunol* **30**, 1665-75.
- Idris A. H., Scalzo A. A. et Yokoyama W. M. (1999) Close genetic linkage of Chok with the NKC-linked loci Cd94, Ly49, and *Cmv1* on mouse chromosome 6. *Immunogenetics* **49**, 906-8.
- Ikarashi Y., Maruoka H., Shinohara K., Sugimura T., Terada M. et Wakasugi H. (1998) Mouse NK1.1+ cytotoxic T cells can be generated by IL-2 exposure from lymphocytes which express an intermediate level of T cell receptor. *Immunol Lett* **61**, 165-73.
- Ikeda H., Lethe B., Lehmann F., van Baren N., Baurain J. F., de Smet C., Chambost H., Vitale M., Moretta A., Boon T. et Coulie P. G. (1997) Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* **6**, 199-208.

- Ioannidis V., Zimmer J., Beermann F. et Held W. (2001) Cre recombinase-mediated inactivation of H-2Dd transgene expression: evidence for partial missing self-recognition by Ly49A NK cells. *J Immunol* **167**, 6256-62.
- Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J. L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L. E. et Tschopp J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-5.
- Itoh N., Tsujimoto Y. et Nagata S. (1993) Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol* **151**, 621-7.
- Jahng A. W., Maricic I., Pedersen B., Burdin N., Naidenko O., Kronenberg M., Koezuka Y. et Kumar V. (2001) Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **194**, 1789-99.
- Janssen O., Sanzenbacher R. et Kabelitz D. (2000) Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res* **301**, 85-99.
- Johansson M. H., Bieberich C., Jay G., Karre K. et Hoglund P. (1997) Natural killer cell tolerance in mice with mosaic expression of major histocompatibility complex class I transgene. *J Exp Med* **186**, 353-64.
- Johansson M. H., Hoglund E., Nakamura M. C., Ryan J. C. et Hoglund P. (1998) Alpha1/alpha2 domains of H-2D(d), but not H-2L(d), induce "missing self" reactivity *in vivo*--no effect of H-2L(d) on protection against NK cells expressing the inhibitory receptor Ly49G2. *Eur J Immunol* **28**, 4198-206.
- Johnson T. R., Hong S., Van Kaer L., Koezuka Y. et Graham B. S. (2002) NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *J Virol* **76**, 4294-303.
- Joyce S., Woods A. S., Yewdell J. W., Bennink J. R., De Silva A. D., Boesteanu A., Balk S. P., Cotter R. J. et Bratkiewicz R. R. (1998) Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science* **279**, 1541-4.
- Kadowaki N., Antonenko S., Ho S., Rissoan M. C., Soumelis V., Porcelli S. A., Lanier L. et Liu Y. J. (2001) Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J Exp Med* **193**, 1221-6.

- Kambayashi T., Assarsson E., Michaelsson J., Berglund P., Diehl A. D., Chambers B. J. et Ljunggren H. G. (2000) Emergence of CD8⁺ T cells expressing NK cell receptors in influenza A virus-infected mice. *J Immunol* **165**, 4964-9.
- Kambayashi T., Michaelsson J., Fahlen L., Chambers B. J., Sentman C. L., Karre K. et Ljunggren H. G. (2001) Purified MHC class I molecules inhibit activated NK cells in a cell-free system *in vitro*. *Eur J Immunol* **31**, 869-75.
- Kane K. P. (1994) Ly-49 mediates EL4 lymphoma adhesion to isolated class I major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* **179**, 1011-5.
- Karlhofer F. M. et Yokoyama W. M. (1991) Stimulation of murine natural killer (NK) cells by a monoclonal antibody specific for the NK1.1 antigen. IL-2-activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. *J Immunol* **146**, 3662-73.
- Karlhofer F. M., Ribaldo R. K. et Yokoyama W. M. (1992) MHC class I alloantigen specificity of Ly-49⁺ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* **358**, 66-70.
- Karlhofer F. M., Hunziker R., Reichlin A., Margulies D. H. et Yokoyama W. M. (1994) Host MHC class I molecules modulate *in vivo* expression of a NK cell receptor. *J Immunol* **153**, 2407-16.
- Karre K., Ljunggren H. G., Piontek G. et Kiessling R. (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**, 675-8.
- Kase A., Johansson M. H., Olsson-Alheim M. Y., Karre K. et Hoglund P. (1998) External and internal calibration of the MHC class I-specific receptor Ly49A on murine natural killer cells. *J Immunol* **161**, 6133-8.
- Kasibhatla S., Genestier L. et Green D. R. (1999) Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* **274**, 987-92.
- Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Motoki K., Ueno H., Nakagawa R., Sato H., Kondo E., Koseki H. et Taniguchi M. (1997) CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**, 1626-9.

- Kiessling R., Petranyi G., Klein G. et Wigzell H. (1975) Genetic variation of *in vitro* cytolytic activity and *in vivo* rejection potential of non-immunized semi-syngeneic mice against a mouse lymphoma line. *Int J Cancer* **15**, 933-40.
- Kiessling R., Hochman P. S., Haller O., Shearer G. M., Wigzell H. et Cudkowicz G. (1977) Evidence for a similar or common mechanism for natural killer cell activity and resistance to hemopoietic grafts. *Eur J Immunol* **7**, 655-63.
- Kim S. et Yokoyama W. M. (1998) NK cell granule exocytosis and cytokine production inhibited by Ly-49A engagement. *Cell Immunol* **183**, 106-12.
- Kim S., Iizuka K., Aguila H. L., Weissman I. L. et Yokoyama W. M. (2000) *In vivo* natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2731-6.
- Kirchhoff S., Muller W. W., Li-Weber M. et Krammer P. H. (2000) Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* **30**, 2765-74.
- Kitamura H., Iwakabe K., Yahata T., Nishimura S., Ohta A., Ohmi Y., Sato M., Takeda K., Okumura K., Van Kaer L., Kawano T., Taniguchi M. et Nishimura T. (1999) The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* **189**, 1121-8.
- Klein E., Vanky F. et Vose B. M. (1978) Natural killer and tumor recognizing lymphocyte activity in tumor patients. *Haematologia* **12**, 107-12.
- Koo G. C. et Peppard J. R. (1984) Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. *Hybridoma* **3**, 301-3.
- Korten S., Wilk E., Gessner J. E., Meyer D. et Schmidt R. E. (1999) Altered donor and recipient Ly49+ NK cell subsets in allogeneic H-2d-H-2b and H-2b-H-2d bone marrow chimeras. *J Immunol* **163**, 5896-905.
- Kramer M. S. (2000) Update on Substance P (NK-1 receptor) antagonists in clinical trials for depression. *Neuropeptides* **34**, 255.
- Krammer P. H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-95.

- Kronenberg M. et Gapin L. (2002) The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 557-68.
- Kubin M., Cassiano L., Chalupny J., Chin W., Cosman D., Fanslow W., Mullberg J., Rousseau A. M., Ulrich D. et Armitage R. (2001) ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur J Immunol* **31**, 1428-37.
- Kubota A., Kubota S., Farrell H. E., Davis-Poynter N. et Takei F. (1999a) Inhibition of NK cells by murine CMV-encoded class I MHC homologue m144. *Cell Immunol* **191**, 145-51.
- Kubota A., Kubota S., Lohwasser S., Mager D. L. et Takei F. (1999b) Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice. *J Immunol* **163**, 212-6.
- Kung S. K. et Miller R. G. (1995) The NK1.1 antigen in NK-mediated F1 antiparent killing *in vitro*. *J Immunol* **154**, 1624-33.
- Kung S. K., Su R. C., Shannon J. et Miller R. G. (1999) The NKR-PIB gene product is an inhibitory receptor on SJL/J NK cells. *J Immunol* **162**, 5876-87.
- Lanier L. L., Corliss B. et Phillips J. H. (1997) Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol Rev* **155**, 145-54.
- Lanier L. L. (1998) NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* **16**, 359-93.
- Lanier L. L., Corliss B., Wu J. et Phillips J. H. (1998a) Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* **8**, 693-701.
- Lanier L. L., Corliss B. C., Wu J., Leong C. et Phillips J. H. (1998b) Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* **391**, 703-7.
- Lantz O. et Bendelac A. (1994) An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med* **180**, 1097-106.
- Latchman Y., McKay P. F. et Reiser H. (1998) Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J Immunol* **161**, 5809-12.

- Lathbury L. J., Allan J. E., Shellam G. R. et Scalzo A. A. (1996) Effect of host genotype in determining the relative roles of natural killer cells and T cells in mediating protection against murine cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* **77**, 2605-13.
- Laufer R., Gilon C., Chorev M. et Selinger Z. (1988) Desensitization with a selective agonist discriminates between multiple tachykinin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **245**, 639-43.
- Le Drean E., Vely F., Olcese L., Cambiaggi A., Guia S., Krystal G., Gervois N., Moretta A., Jotereau F. et Vivier E. (1998) Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur J Immunol* **28**, 264-76.
- Lee N., Llano M., Carretero M., Ishitani A., Navarro F., Lopez-Botet M. et Geraghty D. E. (1998) HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5199-204.
- Lee S. H., Girard S., Macina D., Busa M., Zafer A., Belouchi A., Gros P. et Vidal S. M. (2001) Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat Genet* **28**, 42-5.
- Lehuen A., Lantz O., Beaudoin L., Laloux V., Carnaud C., Bendelac A., Bach J. F. et Monteiro R. C. (1998) Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14-Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* **188**, 1831-9.
- Leite-De-Moraes M. C., Hameg A., Pacilio M., Koezuka Y., Taniguchi M., Van Kaer L., Schneider E., Dy M. et Herbelin A. (2001) IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J Immunol* **166**, 945-51.
- Lemieux S., Ouellet-Talbot F., Lusignan Y., Morelli L., Labreche N., Gosselin P. et Lecomte J. (1991) Identification of murine natural killer cell subsets with monoclonal antibodies derived from 129 anti-C57BL/6 immune spleen cells. *Cell Immunol* **134**, 191-204.

- Leong C. C., Chapman T. L., Bjorkman P. J., Formankova D., Mocarski E. S., Phillips J. H. et Lanier L. L. (1998) Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J Exp Med* **187**, 1681-7.
- Lian R. H., Freeman J. D., Mager D. L. et Takei F. (1998) Role of conserved glycosylation site unique to murine class I MHC in recognition by Ly-49 NK cell receptor. *J Immunol* **161**, 2301-6.
- Lian R. H., Li Y., Kubota S., Mager D. L. et Takei F. (1999) Recognition of class I MHC by NK receptor Ly-49C: identification of critical residues. *J Immunol* **162**, 7271-6.
- Litwin V., Gumperz J., Parham P., Phillips J. H. et Lanier L. L. (1993) Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type. *J Exp Med* **178**, 1321-36.
- Liu J., Morris M. A., Nguyen P., George T. C., Koulich E., Lai W. C., Schatzle J. D., Kumar V. et Bennett M. (2000) Ly49I NK cell receptor transgene inhibition of rejection of H2b mouse bone marrow transplants. *J Immunol* **164**, 1793-9.
- Ljunggren H. G., Yamasaki T., Collins P., Klein G. et Karre K. (1988) Selective acceptance of MHC class I-deficient tumor grafts in the brain. *J Exp Med* **167**, 730-5.
- Ljunggren H. G. et Karre K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11**, 237-44.
- Llano M., Lee N., Navarro F., Garcia P., Albar J. P., Geraghty D. E. et Lopez-Botet M. (1998) HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* **28**, 2854-63.
- Lohwasser S., Hande P., Mager D. L. et Takei F. (1999) Cloning of murine NKG2A, B and C: second family of C-type lectin receptors on murine NK cells. *Eur J Immunol* **29**, 755-61.
- Long E. O., Barber D. F., Burshtyn D. N., Faure M., Peterson M., Rajagopalan S., Renard V., Sandusky M., Stebbins C. C., Wagtmann N. et Watzl C. (2001) Inhibition of

- natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev* **181**, 223-33.
- Lopez-Botet M., Llano M. et Ortega M. (2001) Human cytomegalovirus and natural killer-mediated surveillance of HLA class I expression: a paradigm of host-pathogen adaptation. *Immunol Rev* **181**, 193-202.
- MacDonald H. R., Bommhardt U. et Cerottini J. C. (1995) Developmentally regulated expression of P-glycoprotein (multidrug resistance) activity in mouse thymocytes. *Eur J Immunol* **25**, 1457-60.
- MacDonald M. R., Li X. Y., Stenberg R. M., Campbell A. E. et Virgin H. W. IV (1998a) Mucosal and parenteral vaccination against acute and latent murine cytomegalovirus (MCMV) infection by using an attenuated MCMV mutant. *J Virol* **72**, 442-51.
- MacDonald R. H., Lees R. K. et Held W. (1998b) Developmentally regulated extinction of Ly-49 receptor expression permits maturation and selection of NK1.1+ T cells. *J Exp Med* **187**, 2109-14.
- MacDonald H. R. (2002) Development and selection of NKT cells. *Curr Opin Immunol* **14**, 250-4.
- Maeda M., Lohwasser S., Yamamura T. et Takei F. (2001) Regulation of NKT cells by Ly49: analysis of primary NKT cells and generation of NKT cell line. *J Immunol* **167**, 4180-6.
- Makrigiannis A. P. et Anderson S. K. (2000) Ly49 gene expression in different inbred mouse strains. *Immunol Res* **21**, 39-47.
- Makrigiannis A. P. et Anderson S. K. (2001) The murine Ly49 family: form and function. *Arch Immunol Ther Exp* **49**, 47-50.
- Makrigiannis A. P., Pau A. T., Saleh A., Winkler-Pickett R., Ortaldo J. R. et Anderson S. K. (2001) Class I MHC-binding characteristics of the 129/J Ly49 repertoire. *J Immunol* **166**, 5034-43.
- Mandelboim O., Davis D. M., Reyburn H. T., Vales-Gomez M., Sheu E. G., Pazmany L. et Strominger J. L. (1996) Enhancement of class II-restricted T cell responses by costimulatory NK receptors for class I MHC proteins. *Science* **274**, 2097-100.

- Mandelboim O., Kent S., Davis D. M., Wilson S. B., Okazaki T., Jackson R., Hafler D. et Strominger J. L. (1998) Natural killer activating receptors trigger interferon gamma secretion from T cells and natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3798-803.
- Mandelboim O., Lieberman N., Lev M., Paul L., Arnon T. I., Bushkin Y., Davis D. M., Strominger J. L., Yewdell J. W. et Porgador A. (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* **409**, 1055-60.
- Mandelboim O. et Porgador A. (2001) NKp46. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 1147-50.
- Manilay J. O., Waneck G. L. et Sykes M. (1998) Altered expression of Ly-49 receptors on NK cells developing in mixed allogeneic bone marrow chimeras. *Int Immunol* **10**, 1943-55.
- Manilay J. O., Waneck G. L. et Sykes M. (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* **163**, 2628-33.
- Marti F., Xu C. W., Selvakumar A., Brent R., Dupont B. et King P. D. (1998) LCK-phosphorylated human killer cell-inhibitory receptors recruit and activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 11810-5.
- Mason L. H., Ortaldo J. R., Young H. A., Kumar V., Bennett M. et Anderson S. K. (1995) Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1 : a member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). *J Exp Med* **182**, 293-303.
- Mason L. H., Anderson S. K., Yokoyama W. M., Smith H. R., Winkler-Pickett R. et Ortaldo J. R. (1996) The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *J Exp Med* **184**, 2119-28.
- Mason L. H., Gosselin P., Anderson S. K., Fogler W. E., Ortaldo J. R. et McVicar D. W. (1997) Differential tyrosine phosphorylation of inhibitory versus activating Ly-49 receptor proteins and their recruitment of SHP-1 phosphatase. *J Immunol* **159**, 4187-96.
- Mason L. H., Willette-Brown J., Anderson S. K., Gosselin P., Shores E. W., Love P. E., Ortaldo J. R. et McVicar D. W. (1998) Characterization of an associated 16-kDa

- tyrosine phosphoprotein required for Ly-49D signal transduction. *J Immunol* **160**, 4148-52.
- Mason L. H., Willette-Brown J., Mason A. T., McVicar D. et Ortaldo J. R. (2000) Interaction of Ly-49D+ NK cells with H-2Dd target cells leads to Dap-12 phosphorylation and IFN-gamma secretion. *J Immunol* **164**, 603-11.
- Matsumoto N., Ribaldo R. K., Abastado J. P., Margulies D. H. et Yokoyama W. M. (1998) The lectin-like NK cell receptor Ly-49A recognizes a carbohydrate-independent epitope on its MHC class I ligand. *Immunity* **8**, 245-54.
- Matsumoto N., Mitsuki M., Tajima K., Yokoyama W. M. et Yamamoto K. (2001a) The functional binding site for the C-type lectin-like natural killer cell receptor Ly49A spans three domains of its major histocompatibility complex class I ligand. *J Exp Med* **193**, 147-58.
- Matsumoto N., Yokoyama W. M., Kojima S. et Yamamoto K. (2001b) The NK cell MHC class I receptor Ly49A detects mutations on H-2Dd inside and outside of the peptide binding groove. *J Immunol* **166**, 4422-8.
- Maxwell J. R., Weinberg A., Prell R. A. et Vella A. T. (2000) Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. *J Immunol* **164**, 107-12.
- McGeoch D. J., Cook S., Dolan A., Jamieson F. E. et Telford E. A. (1995) Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* **247**, 443-58.
- McMahon C. W. et Raulet D. H. (2001) Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol* **13**, 465-70.
- McQueen K. L., Lohwasser S., Takei F. et Mager D. L. (1999) Expression analysis of new Ly49 genes: most transcripts of Ly49j lack the transmembrane domain. *Immunogenetics* **49**, 685-91.
- McVicar D. W., Taylor L. S., Gosselin P., Willette-Brown J., Mikhael A. I., Geahlen R. L., Nakamura M. C., Linnemeyer P., Seaman W. E., Anderson S. K., Ortaldo J. R. et Mason L. H. (1998) DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **273**, 32934-42.

- Mehta I. K., Wang J., Roland J., Margulies D. H. et Yokoyama W. M. (2001) Ly49A allelic variation and MHC class I specificity. *Immunogenetics* **53**, 572-83.
- Michaelsson J., Achour A., Salcedo M., Kase-Sjostrom A., Sundback J., Harris R. A. et Karre K. (2000) Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity with soluble major histocompatibility complex class I tetramers. *Eur J Immunol* **30**, 300-7.
- Michaelsson J., Achour A., Rolle A. et Karre K. (2001) MHC class I recognition by NK receptors in the Ly49 family is strongly influenced by the beta 2-microglobulin subunit. *J Immunol* **166**, 7327-34.
- Miller J. S. (2002) Biology of natural killer cells in cancer and infection. *Cancer Invest* **20**, 405-19.
- Mingari M. C., Schiavetti F., Ponte M., Vitale C., Maggi E., Romagnani S., Demarest J., Pantaleo G., Fauci A. S. et Moretta L. (1996) Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 12433-8.
- Mingari M. C., Vitale C., Cantoni C., Bellomo R., Ponte M., Schiavetti F., Bertone S., Moretta A. et Moretta L. (1997) Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. *Eur J Immunol* **27**, 1374-80.
- Mingari M. C., Moretta A. et Moretta L. (1998a) Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. *Immunol Today* **19**, 153-7.
- Mingari M. C., Ponte M., Bertone S., Schiavetti F., Vitale C., Bellomo R., Moretta A. et Moretta L. (1998b) HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 1172-7.
- Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M. C., Biassoni R. et Moretta L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **19**, 197-223.

- Moretta L., Biassoni R., Bottino C., Mingari M. C. et Moretta A. (2000) Human NK-cell receptors. *Immunol Today* **21**, 420-2.
- Motoda K., Takata M., Kiura K., Nakamura I. et Harada M. (2000) SHP-1/immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-independent inhibitory signalling through murine natural killer cell receptor Ly-49A in a transfected B-cell line. *Immunology* **100**, 370-7.
- Murphy W. J., Raziuddin A., Mason L., Kumar V., Bennett M. et Longo D. L. (1995) NK cell subsets in the regulation of murine hematopoiesis. I. 5E6+ NK cells promote hematopoietic growth in H-2d strain mice. *J Immunol* **155**, 2911-7.
- Nagasawa R., Gross J., Kanagawa O., Townsend K., Lanier L. L., Chiller J. et Allison J. P. (1987) Identification of a novel T cell surface disulfide-bonded dimer distinct from the alpha/beta antigen receptor. *J Immunol* **138**, 815-24.
- Nakagawa R., Serizawa I., Motoki K., Sato M., Ueno H., Iijima R., Nakamura H., Shimosaka A. et Koezuka Y. (2000) Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells. *Oncol Res* **12**, 51-8.
- Nakajima H., Yamada N. et Takiguchi M. (1998) Fas-independent apoptosis of T cells via killer cell inhibitory receptors. *Int Immunol* **10**, 85-90.
- Nakajima H., Samaridis J., Angman L. et Colonna M. (1999) Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol* **162**, 5-8.
- Nakamura M. C., Niemi E. C., Fisher M. J., Shultz L. D., Seaman W. E. et Ryan J. C. (1997) Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in natural killer cell cytotoxicity and functionally associates with the SHP-1 tyrosine phosphatase. *J Exp Med* **185**, 673-84.
- Nakamura M. C., Linnemeyer P. A., Niemi E. C., Mason L. H., Ortaldo J. R., Ryan J. C. et Seaman W. E. (1999) Mouse Ly-49D recognizes H-2Dd and activates natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* **189**, 493-500.

- Nakamura M. C., Hayashi S., Niemi E. C., Ryan J. C. et Seaman W. E. (2000) Activating Ly-49D and inhibitory Ly-49A natural killer cell receptors demonstrate distinct requirements for interaction with H2-D(d). *J Exp Med* **192**, 447-54.
- Nakamura M. C. et Seaman W. E. (2001) Ligand interactions by activating and inhibitory Ly-49 receptors. *Immunol Rev* **181**, 138-48.
- Natarajan K., Boyd L. F., Schuck P., Yokoyama W. M., Eliat D. et Margulies D. H. (1999) Interaction of the NK cell inhibitory receptor Ly49A with H-2Dd : identification of a site distinct from the TCR site. *Immunity* **11**, 591-601.
- Naumov Y. N., Bahjat K. S., Gausling R., Abraham R., Exley M. A., Koezuka Y., Balk S. B., Strominger J. L., Clare-Salzer M. et Wilson S. B. (2001) Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13838-43.
- Niaudet P., Greaves M. et Horwitz D. (1979) Phenotypes of 'null' lymphoid cells in human blood. *Scand J Immunol* **9**, 387-93.
- Nishimura H., Washizu J., Naiki Y., Hara T., Fukui Y., Sasazuki T. et Yoshikai Y. (1999) MHC class II-dependent NK1.1+ gammadelta T cells are induced in mice by Salmonella infection. *J Immunol* **162**, 1573-81.
- Nishimura T., Kitamura H., Iwakabe K., Yahata T., Ohta A., Sato M., Takeda K., Okumura K., Van Kaer L., Kawano T., Taniguchi M., Nakui M., Sekimoto M. et Koda T. (2000) The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* **12**, 987-94.
- Nomura M., Takihara Y., Yasunaga T. et Shimada K. (1994) One of the retinoic acid-inducible cDNA clones in mouse embryonal carcinoma F9 cells encodes a novel isoenzyme of fructose 1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett* **348**, 201-5.
- Noppen C., Schaefer C., Zajac P., Schutz A., Kocher T., Kloth J., Heberer M., Colonna M., De Libero G. et Spagnoli G. C. (1998) C-type lectin-like receptors in peptide-specific HLA class I-restricted cytotoxic T lymphocytes: differential expression

- and modulation of effector functions in clones sharing identical TCR structure and epitope specificity. *Eur J Immunol* **28**, 1134-42.
- Oberg L., Eriksson M., Fahlen L. et Sentman C. L. (2000) Expression of Ly49A on T cells alters the threshold for T cell responses. *Eur J Immunol* **30**, 2849-56.
- 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 Infect* **2**, 371-80.
- Ochi H. et Watanabe T. (2000) Negative regulation of B cell receptor-mediated signaling in B-1 cells through CD5 and Ly49 co-receptors via Lyn kinase activity. *Int Immunol* **12**, 1417-23.
- Ohlen C., Kling G., Hoglund P., Hansson M., Scangos G., Bieberich C., Jay G. et Karre K. (1989) Prevention of allogeneic bone marrow graft rejection by H-2 transgene in donor mice. *Science* **246**, 666-8.
- Olcese L., Lang P., Vely F., Cambiaggi A., Marguet D., Blery M., Hippen K. L., Biassoni R., Moretta A., Moretta L., Cambier J. C. et Vivier E. (1996) Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* **156**, 4531-4.
- Olcese L., Cambiaggi A., Semenzato G., Bottino C., Moretta A. et Vivier E. (1997) Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunol* **158**, 5083-6.
- Olsson M. Y., Karre K. et Sentman C. L. (1995) Altered phenotype and function of natural killer cells expressing the major histocompatibility complex receptor Ly-49 in mice transgenic for its ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 1649-53.
- Olsson-Alheim M. Y., Salcedo M., Ljunggren H. G., Karre K. et Sentman C. L. (1997) NK cell receptor calibration: effects of MHC class I induction on killing by Ly49A^{high} and Ly49A^{low} NK cells. *J Immunol* **159**, 3189-94.
- Olsson-Alheim M. Y., Sundback J., Karre K. et Sentman C. L. (1999) The MHC class I molecule H-2Dp inhibits murine NK cells via the inhibitory receptor Ly49A. *J Immunol* **162**, 7010-4.

- Olver S. D., Price P. et Shellam G. R. (1994) Cytomegalovirus hepatitis: characterization of the inflammatory infiltrate in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol* **98**, 375-81.
- Orange J. S., Wang B., Terhorst C. et Biron C. A. (1995) Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* **182**, 1045-56.
- Orihuela M., Margulies D. H. et Yokoyama W. M. (1996) The natural killer cell receptor Ly-49A recognizes a peptide-induced conformational determinant on its major histocompatibility complex class I ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11792-7.
- Ortaldo J. R., Mason L. H., Gregorio T. A., Stoll J. et Winkler-Pickett R. T. (1997) The Ly-49 family: regulation of cytokine production in murine NK cells. *J Leukoc Biol* **62**, 381-8.
- Ortaldo J. R., Winkler-Pickett R., Mason A. T. et Mason L. H. (1998) The Ly-49 family: regulation of cytotoxicity and cytokine production in murine CD3+ cells. *J Immunol* **160**, 1158-65.
- Ortaldo J. R., Mason A. T., Winkler-Pickett R., Raziuddin A., Murphy W. J. et Mason L. H. (1999a) Ly-49 receptor expression and functional analysis in multiple mouse strains. *J Leukoc Biol* **66**, 512-20.
- Ortaldo J. R., Winkler-Pickett R., Willette-Brown J., Wange R. L., Anderson S. K., Palumbo G. J., Mason L. H. et McVicar D. W. (1999b) Structure/function relationship of activating Ly-49D and inhibitory Ly-49G2 NK receptors. *J Immunol* **163**, 5269-77.
- Ortaldo J. R., Bere E. W., Hodge D. et Young H. A. (2001) Activating Ly-49 NK receptors: central role in cytokine and chemokine production. *J Immunol* **166**, 4994-9.
- Osman Y., Kawamura T., Naito T., Takeda K., Van Kaer L., Okumura K. et Abo T. (2000) Activation of hepatic NKT cells and subsequent liver injury following administration of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* **30**, 1919-28.

- 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., p. 158. Université Laval, Québec.
- Park B., Oh H., Lee S., Song Y., Shin J., Sung Y. C., Hwang S. Y. et Ahn K. (2002) The MHC Class I Homolog of Human Cytomegalovirus Is Resistant to Down-Regulation Mediated by the Unique Short Region Protein (US)2, US3, US6, and US11 Gene Products. *J Immunol* **168**, 3464-9.
- Pauza M., Smith K. M., Neal H., Reilly C., Lanier L. L. et Lo D. (2000) Transgenic expression of Ly-49A in thymocytes alters repertoire selection. *J Immunol* **164**, 884-92.
- Peacock C. D., Lin M. Y., Ortaldo J. R. et Welsh R. M. (2000) The virus-specific and allospecific cytotoxic T-lymphocyte response to lymphocytic choriomeningitis virus is modified in a subpopulation of CD8(+) T cells coexpressing the inhibitory major histocompatibility complex class I receptor Ly49G2. *J Virol* **74**, 7032-8.
- Pellicci D. G., Hammond K. J. L., Uldrich A. G. B., Baxter A. G., Smyth M. J. et Godfrey D. I. (2002) A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1⁺CD4⁺ CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* **195**, 835-44.
- Peritt D., Robertson S., Gri G., Showe L., Aste-Amezaga M. et Trinchieri G. (1998) Cutting Edge : Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* **161**, 5821-24.
- Plougastel B., Matsumoto K., Dubbelde C. et Yokoyama W. M. (2001) Analysis of a 1-Mb BAC contig overlapping the mouse Nkrp1 cluster of genes: cloning of three new Nkrp1 members, Nkrp1d, Nkrp1e, and Nkrp1f. *Immunogenetics* **53**, 592-8.
- Poggi A., Tomasello E., Revello V., Nanni L., Costa P. et Moretta L. (1997) p40 molecule regulates NK cell activation mediated by NK receptors for HLA class I antigens and TCR-mediated triggering of T lymphocytes. *Int Immunol* **9**, 1271-9.
- Price P., Olver S. D., Gibbons A. E., Teo H. K. et Shellam G. R. (1993) Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. *Immunol Cell Biol* **71**, 155-65.

- Rajagopalan S., Fu J. et Long E. O. (2001) Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* **167**,1877-81.
- Raulet D. H., Held W., Correa I., Dorfman J. R., Wu M. F. et Corral L. (1997) Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev* **155**, 41-52.
- Raulet D. H., Vance R. E. et McMahon C. W. (2001) Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol* **19**, 291-330.
- Ravetch J. V. et Lanier L. L. (2000) Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84-9.
- Rawlinson W. D., Farrell H. E. et Barrell B. G. (1996) Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus. *J Virol* **70**, 8833-49.
- Raziuddin A., Longo D. L., Mason L., Ortaldo J. R., Bennett M. et Murphy W. J. (1998) Differential effects of the rejection of bone marrow allografts by the depletion of activating versus inhibiting Ly-49 natural killer cell subsets. *J Immunol* **160**, 87-94.
- Reddehase M. J. (2000) The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. *Curr Opin Immunol* **12**, 390-6.
- Reichlin A. et Yokoyama W. M. (1998) Natural killer cell proliferation induced by anti-NK1.1 and IL-2. *Immunol Cell Biol* **76**, 143-52.
- Renard V., Cambiaggi A., Vely F., Blery M., Olcese L., Olivero S., Bouchet M. et Vivier E. (1997) Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* **155**, 205-21.
- Robbins S. H., Nguyen K. B., Takahashi N., Mikayama T., Biron C. A. et Brossay L. (2002) Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor g1 molecule during the activation of mouse NK cells. *J Immunol* **168**, 2585-9.
- Rogers P. R., Song J., Gramaglia I., Killeen N. et Croft M. (2001) OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* **15**, 445-55.

- Rook A. H. (1988) Interactions of cytomegalovirus with the human immune system. *Rev Infect Dis* **10 Suppl 3**, S460-7.
- Roth C., Carlyle J. R., Takizawa H. et Raulet D. H. (2000) Clonal acquisition of inhibitory Ly49 receptors on developing NK cells is successively restricted and regulated by stromal class I MHC. *Immunity* **13**, 143-53.
- Ryan J. C., Niemi E. C., Nakamura M. C. et Seaman W. E. (1995) NKR-P1A is a target-specific receptor that activates natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med* **181**, 1911-5.
- Ryan J. C., Naper C., Hayashi S. et Daws M. R. (2001) Physiologic functions of activating natural killer (NK) complex-encoded receptors on NK cells. *Immunol Rev* **181**, 126-37.
- Sato H., Nakayama T., Tanaka Y., Yamashita M., Shibata Y., Kondo E., Saito Y. et Taniguchi M. (1999) Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature Valpha14 NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7439-44.
- Scalzo A. A., Fitzgerald N. A., Simmons A., La Vista A. B. et Shellam G. R. (1990) *Cmv-1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med* **171**, 1469-83.
- Scalzo A. A., Fitzgerald N. A., Wallace C. R., Gibbons A. E., Smart Y. C., Burton R. C. et Shellam G. R. (1992) The effect of the *Cmv-1* resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol* **149**, 581-9.
- Scalzo A. A., Lyons P. A., Fitzgerald N. A., Forbes C. A., Yokoyama W. M. et Shellam G. R. (1995) Genetic mapping of *Cmv1* in the region of mouse chromosome 6 encoding the NK gene complex-associated loci Ly49 and musNKR-P1. *Genomics* **27**, 435-41.
- Scalzo A. A., Brown M. G., Chu D. T., Heusel J. W., Yokoyama W. M. et Forbes C. A. (1999) Development of intra-natural killer complex (NKC) recombinant and congenic mouse strains for mapping and functional analysis of NK cell regulatory loci. *Immunogenetics* **49**, 238-41.

- Salcedo M., Diehl A. D., Olsson-Alheim M. Y., Sundback J., Van Kaer L., Karre K. et Ljunggren H. G. (1997) Altered expression of Ly49 inhibitory receptors on natural killer cells from MHC class I-deficient mice. *J Immunol* **158**, 3174-80.
- Salcedo M., Bouso P., Ljunggren H. G., Kourilsky P. et Abastado J. P. (1998) The Qa-1b molecule binds to a large subpopulation of murine NK cells. *Eur J Immunol* **28**, 4356-61.
- Scharton-Kersten T. M. et Sher A. (1997) Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr Opin Immunol* **9**, 44-51.
- Scott P. et Trinchieri G. (1995) The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr Opin Immunol* **7**, 34-40.
- Sentman C. L., Olsson M. Y., Salcedo M., Hoglund P., Lendahl U. et Kare K. (1994) H-2 allele-specific protection from NK cell lysis *in vitro* for lymphoblasts but not tumor targets. Protection mediated by alpha 1/alpha 2 domains. *J Immunol* **153**, 5482-90.
- Sentman C. L., Olsson M. Y. et Karre K. (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* **7**, 109-19.
- Sharif S., Arreaza G. A., Zucker P., Mi Q. S., Sondhi J., Naidenko O. V., Kronenberg M., Koezuka Y., Delovitch T. L., Gombert J. M., Leite-De-Moraes M., Gouarin C., Zhu R., Hameg A., Nakayama T., Taniguchi M., Lepault F., Lehuen A., Bach J. F. et Herbelin A. (2001) Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* **7**, 1057-62.
- Shellam G. R., Allan J. E., Papadimitriou J. M. et Bancroft G. J. (1981) Increased susceptibility to cytomegalovirus infection in beige mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 5104-8.
- Shimamura M., Huang Y.-Y., Suda Y., Kusumoto S., Sato K., Grusby M. J., Sato H., Nakayama T. et Taniguchi M. (1999) Positive selection of NKT cells by CD1⁺, CD11c⁺ non-lymphoid cells residing in the extrathymic organs. *Eur J Immunol* **12**:3962-70.

- Siegel R. M., Chan F. K., Chun H. J. et Lenardo M. J. (2000) The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* **1**, 469-74.
- Silver E. T., Gong D. E., Chang C. S., Amrani A., Santamaria P. et Kane K. P. (2000) Ly-49P activates NK-mediated lysis by recognizing H-2Dd. *J Immunol* **165**, 1771-81.
- Silver E. T., Gong D., Hazes B. et Kane K. P. (2001) Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H-2D(k) and H-2D(d). *J Immunol* **166**, 2333-41.
- Sinclair J. et Sissons P. (1996) Latent and persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology* **39**, 293-301.
- Singh A. K., Wilson M. T., Hong S., Olivares-Villagomez D., Du C., Stanic A. K., Joyce S., Sriram S., Koezuka Y. et Van Kaer L. (2001) Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **194**, 1801-11.
- Sinzger C. et Jahn G. (1996) Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* **39**, 302-19.
- Sivakumar P. V., Bennett M. et Kumar V. (1997) Fetal and neonatal NK1.1+ Ly-49- cells can distinguish between major histocompatibility complex class I(hi) and class I(lo) target cells: evidence for a Ly-49-independent negative signaling receptor. *Eur J Immunol* **27**, 3100-4.
- Sivakumar P. V., Gunturi A., Salcedo M., Schatzle J. D., Lai W. C., Kurepa Z., Pitcher L., Seaman M. S., Lemonnier F. A., Bennett M., Forman J. et Kumar V. (1999) Cutting edge: expression of functional CD94/NKG2A inhibitory receptors on fetal NK1.1+Ly-49- cells: a possible mechanism of tolerance during NK cell development. *J Immunol* **162**, 6976-80.
- Sjolin H., Tomasello E., Mousavi-Jazi M., Bartolazzi A., Karre K., Vivier E. et Cerboni C. (2002) Pivotal Role of KARAP/DAP12 Adaptor Molecule in the Natural Killer Cell-mediated Resistance to Murine Cytomegalovirus Infection. *J Exp Med* **195**, 825-834.

- Slater J. S. et Campbell A. E. (1997) Down-regulation of MHC class I synthesis by murine cytomegalovirus occurs in immortalized but not primary fibroblasts. *Virology* **229**, 221-7.
- Slifka M. K., Pagarigan R. R. et Whitton J. L. (2000) NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells. *J Immunol* **164**, 2009-15.
- Smith H. R., Karlhofer F. M. et Yokoyama W. M. (1994) Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated NK cells. *J Immunol* **153**, 1068-79.
- Smith H. R., Chuang H. H., Wang L. L., Salcedo M., Heusel J. W. et Yokoyama W. M. (2000) Nonstochastic coexpression of activation receptors on murine natural killer cells. *J Exp Med* **191**, 1341-54.
- Smith H. R., Idris A. H. et Yokoyama W. M. (2001) Murine natural killer cell activation receptors. *Immunol Rev* **181**, 115-25.
- Smith K. M., Wu J., Bakker A. B., Phillips J. H. et Lanier L. L. (1998) Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *J Immunol* **161**, 7-10.
- Smith M. A. et Brennessel D. J. (1994) Cytomegalovirus. *Infect Dis Clin North Am* **8**, 427-38.
- Smyth M. J., Thia K. Y., Street S. E., Cretney E., Trapani J. A., Taniguchi M., Kawano T., Pelikan S. B., Crowe N. Y. et Godfrey D. I. (2000) Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* **191**, 661-8.
- Smyth M. J., Crowe N. Y., Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H. et Godfrey D. I. (2002a) NKT cells --- conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* **14**, 165-71.
- Smyth M. J., Crowe N. Y., Pellicci D. G., Kyparissoudis K., Kelly J. M., Takeda K., Yagita H. et Godfrey D. I. (2002b) Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* **99**, 1259-66.
- Snover D. C. et Horwitz C. A. (1984) Liver disease in cytomegalovirus mononucleosis: a light microscopical and immunoperoxidase study of six cases. *Hepatology* **4**, 408-12.

- Spaggiari G. M., Contini P., Carosio R., Arvigo M., Ghio M., Oddone D., Dondero A., Zocchi M. R., Puppo F., Indiveri F. et Poggi A. (2002) Soluble HLA class I molecules induce natural killer cell apoptosis through the engagement of CD8: evidence for a negative regulation exerted by members of the inhibitory receptor superfamily. *Blood* **99**, 1706-14.
- Speiser D. E., Pittet M. J., Valmori D., Dunbar R., Rimoldi D., Lienard D., MacDonald H. R., Cerottini J. C., Cerundolo V. et Romero P. (1999a) *In vivo* expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* **190**, 775-82.
- Speiser D. E., Valmori D., Rimoldi D., Pittet M. J., Lienard D., Cerundolo V., MacDonald H. R., Cerottini J. C. et Romero P. (1999b) CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients. *Eur J Immunol* **29**, 1990-9.
- Sturmhofel K. et Hammerling G. J. (1990) Reconstitution of H-2 class I expression by gene transfection decreases susceptibility to natural killer cells of an EL4 class I loss variant. *Eur J Immunol* **20**, 171-7.
- Su R. C., Kung S. K., Silver E. T., Lemieux S., Kane K. P. et Miller R. G. (1999) Ly-49CB6 NK inhibitory receptor recognizes peptide-receptive H-2Kb. *J Immunol* **163**, 5319-30.
- Sugie T., Kubota H., Sato M., Nakamura E., Imamura M. et Minato N. (1996) NK 1+ CD4- CD8- alpha beta T cells in the peritoneal cavity: specific T cell receptor-mediated cytotoxicity and selective IFN-gamma production against B cell leukemia and myeloma cells. *J Immunol* **157**, 3925-35.
- Sundback J., Karre K. et Sentman C. L. (1996) Cloning of minimally divergent allelic forms of the natural killer (NK) receptor Ly-49C, differentially controlled by host genes in the MHC and NK gene complexes. *J Immunol* **157**, 3936-42.
- Sundback J., Nakamura M. C., Waldenstrom M., Niemi E. C., Seaman W. E., Ryan J. C. et Karre K. (1998) The alpha2 domain of H-2Dd restricts the allelic specificity of the murine NK cell inhibitory receptor Ly-49A. *J Immunol* **160**, 5971-8.

- Sundback J., Achour A., Michaelsson J., Lindstrom H. et Karre K. (2002) NK cell inhibitory receptor Ly-49C residues involved in MHC class I binding. *J Immunol* **168**, 793-800.
- Sutherland C. L., Chalupny N. J. et Cosman D. (2001) The UL16-binding proteins, a novel family of MHC class I-related ligands for NKG2D, activate natural killer cell functions. *Immunol Rev* **181**, 185-92.
- Sutherland C. L., Chalupny N. J., Schooley K., VandenBos T., Kubin M. et Cosman D. (2002) UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* **168**, 671-9.
- Sykes M., Harty M. W., Karlhofer F. M., Pearson D. A., Szot G. et Yokoyama W. (1993) Hematopoietic cells and radioresistant host elements influence natural killer cell differentiation. *J Exp Med* **178**, 223-9.
- Takeda K., Oshima H., Hayakawa Y., Akiba H., Atsuta M., Kobata T., Kobayashi K., Ito M., Yagita H. et Okumura K. (2000) CD27-mediated activation of murine NK cells. *J Immunol* **164**, 1741-5.
- Takeda K., Hayakawa Y., Smyth M. J., Kayagaki N., Yamaguchi N., Kakuta S., Iwakura Y., Yagita H. et Okumura K. (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* **7**, 94-100.
- Takei F., Brennan J. et Mager D. L. (1997) The Ly-49 family: genes, proteins and recognition of class I MHC. *Immunol Rev* **155**, 67-77.
- Takei F., McQueen K. L., Maeda M., Wilhelm B. T., Lohwasser S., Lian R. H. et Mager D. L. (2001) Ly49 and CD94/NKG2: developmentally regulated expression and evolution. *Immunol Rev* **181**, 90-103.
- Taniguchi M., Koseki H., Tokuhisa T., Masuda K., Sato H., Kondo E., Kawano T., Cui J., Perkes A., Koyasu S. et Makino Y. (1996) Essential requirement of an invariant V alpha 14 T cell antigen receptor expression in the development of natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11025-8.

- Tay C. H. et Welsh R. M. (1997) Distinct organ-dependent mechanisms for the control of murine cytomegalovirus infection by natural killer cells. *J Virol* **71**, 267-75.
- Tay C. H., Yu L. Y., Kumar V., Mason L., Ortaldo J. R. et Welsh R. M. (1999) The role of LY49 NK cell subsets in the regulation of murine cytomegalovirus infections. *J Immunol* **162**, 718-26.
- Terabe M., Matsui S., Noben-Trauth N., Chen H., Watson C., Donaldson D. D., Carbone D. P., Paul W. E. et Berzofsky J. A. (2000) NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* **1**, 515-20.
- Thorley-Lawson D. A., Ianelli C., Klamann L. D., Staunton D. et Yokoyama S. (1993) Function of CD48 and its regulation by Epstein-Barr virus. *Biochem Soc Trans* **21**, 976-80.
- Tomasec P., Braud V. M., Rickards C., Powell M. B., McSharry B. P., Gadola S., Cerundolo V., Borysiewicz L. K., McMichael A. J. et Wilkinson G. W. (2000) Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* **287**, 1031.
- Tomasello E., Blery M., Vely E. et Vivier E. (2000a) Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells. *Semin Immunol* **12**, 139-47.
- Tomasello E., Desmoulins P. O., Chemin K., Guia S., Cremer H., Ortaldo J., Love P., Kaiserlian D. et Vivier E. (2000b) Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice. *Immunity* **13**, 355-64.
- Tomura M., Yu W. G., Ahn H. J., Yamashita M., Yang Y. F., Ono S., Hamaoka T., Kawano T., Taniguchi M., Koezuka Y. et Fujiwara H. (1999) A novel function of V α 14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J Immunol* **163**, 93-101.
- Toomey J. A., Salcedo M., Cotterill L. A., Millrain M. M., Chrzanowska-Lightowler Z., Lawry J., Fraser K., Gays F., Robinson J. H., Shrestha S., Dyson P. J. et Brooks C. G. (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* **163**, 3176-84.
- Tormo J., Natarajan K., Margulies D. H. et Mariuzza R. A. (1999) Crystal structure of a lectin-like natural killer cell receptor bound to its MHC class I ligand. *Nature* **402**, 623-31.
- Tortorella D., Gewurz B., Schust D., Furman M. et Ploegh H. (2000) Down-regulation of MHC class I antigen presentation by HCMV; lessons for tumor immunology. *Immunol Invest* **29**, 97-100.
- Trinchieri G. (1989) Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* **47**, 187-376.
- Trinchieri G. (1994) Recognition of major histocompatibility complex class I antigens by natural killer cells. *J Exp Med* **180**, 417-21.
- Ugolini S. et Vivier E. (2000) Regulation of T cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* **12**, 295-300.
- Ugolini S., Arpin C., Anfossi N., Walzer T., Cambiaggi A., Forster R., Lipp M., Toes R. E., Melief C. J., Marvel J. et Vivier E. (2001) Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* **2**, 430-5.
- Ulbrecht M., Martinozzi S., Grzeschik M., Hengel H., Ellwart J. W., Pla M. et Weiss E. H. (2000) Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol* **164**, 5019-22.
- Unanue E. R. (1997) Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of Listeria resistance. *Curr Opin Immunol* **9**, 35-43.
- Vales-Gomez M., Reyburn H. T., Erskine R. A. et Strominger J. (1998a) Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 14326-31.
- Vales-Gomez M., Reyburn H. T., Mandelboim M. et Strominger J. L. (1998b) Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors. *Immunity* **9**, 337-44.

- Vales-Gomez M., Reyburn H. T., Erskine R. A., Lopez-Botet M. et Strominger J. L. (1999) Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *Embo J* **18**, 4250-60.
- Valiante N. M., Phillips J. H., Lanier L. L. et Parham P. (1996) Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC-gamma signaling complex in human natural killer (NK) cells. *J Exp Med* **184**, 2243-50.
- Valiante N. M., Uhrberg M., Shilling H. G., Lienert-Weidenbach K., Arnett K. L., D'Andrea A., Phillips J. H., Lanier L. L. et Parham P. (1997) Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* **7**, 739-51.
- Vance R. E., Kraft J. R., Altman J. D., Jensen P. E. et Raulet D. H. (1998) Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med* **188**, 1841-8.
- Vance R. E., Jamieson A. M., Cado D. et Raulet D. H. (2002) Implications of CD94 deficiency and monoallelic NKG2A expression for natural killer cell development and repertoire formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 868-73.
- Vargas-Cortes M., O'Donnell C. L., Maciaszek J. W. et Welsh R. M. (1992) Generation of "natural killer cell-escape" variants of Pichinde virus during acute and persistent infections. *J Virol* **66**, 2532-5.
- Vivier E. et Daeron M. (1997) Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* **18**, 286-91.
- Wang J., Whitman M. C., Natarajan K., Tormo J., Mariuzza R. A. et Margulies D. H. (2002) Binding of the natural killer cell inhibitory receptor Ly49A to its major histocompatibility complex class I ligand. Crucial contacts include both H-2Dd and beta 2-microglobulin. *J Biol Chem* **277**, 1433-42.
- Wattre P., Dewilde A. et Lobert P. E. (1995) Actualités sur la pathologie du cytomégalo virus humain. *Rev Med Interne* **16**, 354-67.

- Weatherill A. R., Maxwell J. R., Takahashi C., Weinberg A. D. et Vella A. T. (2001) OX40 ligation enhances cell cycle turnover of Ag-activated CD4 T cells *in vivo*. *Cell Immunol* **209**, 63-75.
- Welsh R. M., Haspel M. V., Parker D. C. et Holmes K. V. (1986) Natural cytotoxicity against mouse hepatitis virus-infected cells. II. A cytotoxic effector cell with a B lymphocyte phenotype. *J Immunol* **136**, 1454-60.
- Welsh R. M., Dundon P. L., Eynon E. E., Brubaker J. O., Koo G. C. et O'Donnell C. L. (1990) Demonstration of the antiviral role of natural killer cells *in vivo* with a natural killer cell-specific monoclonal antibody (NK 1.1). *Nat Immun Cell Growth Regul* **9**, 112-20.
- Westgaard I. H., Berg S. F., Orstavik S., Fossum S. et Dissen E. (1998) Identification of a human member of the Ly-49 multigene family. *Eur J Immunol* **28**, 1839-46.
- Whitelaw P. F. et Croy B. A. (1996) Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta* **17**, 533-43.
- Wilhelm B. T., McQueen K. L., Freeman J. D., Takei F. et Mager D. L. (2001) Comparative analysis of the promoter regions and transcriptional start sites of mouse Ly49 genes. *Immunogenetics* **53**, 215-24.
- Williams N. S., Kubota A., Bennett M., Kumar V. et Takei F. (2000) Clonal analysis of NK cell development from bone marrow progenitors *in vitro*: orderly acquisition of receptor gene expression. *Eur J Immunol* **30**, 2074-82.
- Wilson L. B. et Hand G. A. (1998) Segmental effect of spinal NK-1 receptor blockade on the pressor reflex. *Am J Physiol* **275**, H789-96.
- Wilson M. J., Lindquist J. A. et Trowsdale J. (2000) DAP12 and KAP10 (DAP10)-novel transmembrane adapter proteins of the CD3zeta family. *Immunol Res* **22**, 21-42.
- Wilson S. B. et Byrne M. C. (2001) Gene expression in NKT cells: defining a functionally distinct CD1d-restricted T cell subset. *Curr Opin Immunol* **13**, 555-61.
- Winter C. C., Gumperz J. E., Parham P., Long E. O. et Wagtmann N. (1998) Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* **161**, 571-7.

- Wolan D. W., Teyton L., Rudolph M. G., Villmow B., Bauer S., Busch D. H. et Wilson I. A. (2001) Crystal structure of the murine NK cell-activating receptor NKG2D at 1.95 Å. *Nat Immunol* **2**, 248-54.
- Wong S., Freeman J. D., Kelleher C., Mager D. et Takei F. (1991) Ly-49 multigene family. New members of a superfamily of type II membrane proteins with lectin-like domains. *J Immunol* **147**, 1417-23.
- Wu J., Song Y., Bakker A. B., Bauer S., Spies T., Lanier L. L. et Phillips J. H. (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* **285**, 730-2.
- Xiao S., Matsui K., Fine A., Zhu B., Marshak-Rothstein A., Widom R. L. et Ju S. T. (1999) FasL promoter activation by IL-2 through SP1 and NFAT but not Egr-2 and Egr-3. *Eur J Immunol* **29**, 3456-65.
- Yokoyama W. M., Kehn P. J., Cohen D. I. et Shevach E. M. (1990) Chromosomal location of the Ly-49 (A1, YE1/48) multigene family. Genetic association with the NK 1.1 antigen. *J Immunol* **145**, 2353-8.
- Yokoyama W. M., Ryan J. C., Hunter J. J., Smith H. R., Stark M. et Seaman W. E. (1991) cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with LY-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6. *J Immunol* **147**, 3229-36.
- Yokoyama W. M. (1993) Recognition structures on natural killer cells. *Curr Opin Immunol* **5**, 67-73.
- Yoshimoto T. et Paul W. E. (1994) CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to *in vivo* challenge with anti-CD3. *J Exp Med* **179**, 1285-95.
- Yu H., Fehniger T. A., Fuchshuber P., Thiel K. S., Vivier E., Carson W. E. et Caligiuri M. A. (1998) Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* **92**, 3647-57.
- Yu Y. Y., George T., Dorfman J. R., Roland J., Kumar V. et Bennett M. (1996) The role of Ly49A and 5E6(Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts. *Immunity* **4**, 67-76.

- Zajac A. J., Vance R. E., Held W., Sourdive D. J., Altman J. D., Raulet D. H. et Ahmed R. (1999) Impaired anti-viral T cell responses due to expression of the Ly49A inhibitory receptor. *J Immunol* **163**, 5526-34.
- Zamai L., Ahmad M., Bennett I. M., Azzoni L., Alnemri E. S. et Perussia B. (1998) Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* **188**, 2375-80.
- Zhang Y., Song T. T., Cunnick J. E., Murphy P. A. et Hendrich S. (1999) Daidzein and genistein glucuronides *in vitro* are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr* **129**, 399-405.
- Zimmer J., Ioannidis V. et Held W. (2001) H-2D ligand expression by Ly49A+ natural killer (NK) cells precludes ligand uptake from environmental cells: implications for NK cell function. *J Exp Med* **194**, 1531-9.

ANNEXE A

Tableau 1

Spécificités des récepteurs Ly49 le plus souvent mentionnés dans le texte pour les haplotypes H-2^d et H-2^b.

<u>Récepteur</u>	<u>Ligand(s)</u>
Ly49A	H-2D ^d
Ly49C	H-2D ^d , H-2K ^d , H-2K ^b
Ly49D	H-2D ^d
Ly49G2	H-2D ^d
Ly49I	H-2D ^d , H-2K ^d , H-2K ^b

revu par Anderson *et al.*, 20001 ainsi que par Takei *et al.*, 2001

ANNEXE B

Tableau 2

Spécificités des récepteurs Ly49A et Ly49C pour les haplotypes H-2^d et H-2^b.

Ly49A	Type d'analyse		
	Adhésion	Tétramère	Fonctionnelle
Haplotype H-2^d			
<i>K^d</i>	- 2-3,7,13,21*	- 21	- 1,9,18
<i>D^d</i>	+ 2-3,7,16,18,21,23,33	+ 21,28	+ 1-2,4-5,8-12,14,16,18-19,23,29
<i>L^d</i>	- 2,6	- 21	- 1,9,14
Haplotype H-2^b			
<i>K^b</i>	± 3,21	- 21,28	- 5,15
<i>D^b</i>	- 2-3,21,32	± 21,28	- 1,4,9,19,29
Ly49C	Type d'analyse		
	Adhésion	Tétramère	Fonctionnelle
Haplotype H-2^d			
<i>K^d</i>	+ 7,21	+ 21	
<i>D^d</i>	+ 7,16,21-22	± 21,28	+ 16
<i>L^d</i>		- 21	
Haplotype H-2^b			
<i>K^b</i>	+ 7,20-22,24	+ 21,28	+ 20,30-31
<i>D^b</i>	± 7,21,22,24	+ 21,28	- 30

+ indique que l'interaction Ly49/H-2 a été démontré

- indique que l'interaction Ly49/H-2 n'a pas été démontré

± indique que l'interaction Ly49/H-2 n'est pas clairement identifiée

* références

ANNEXE C

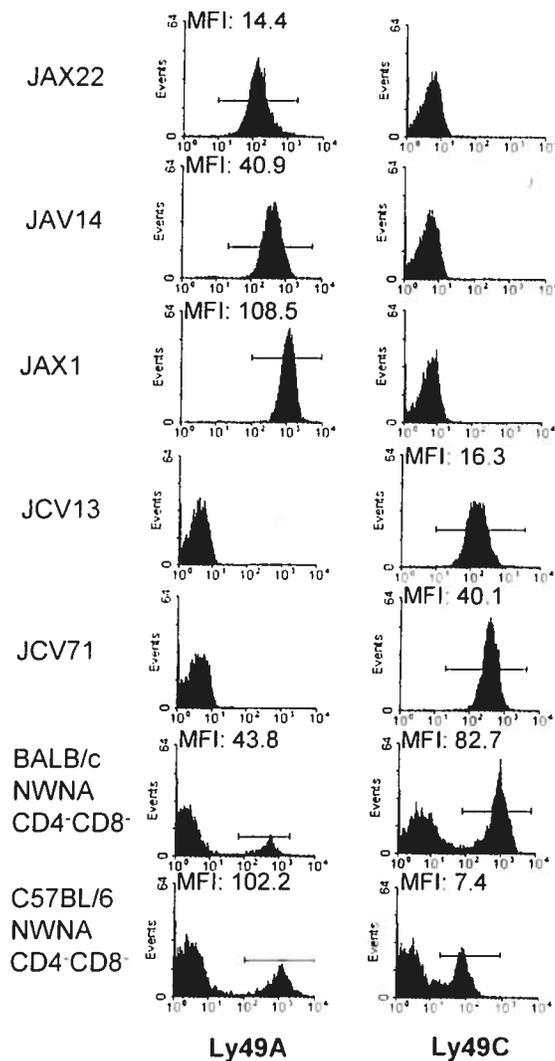


Fig 6. Comparative analysis of the level of expression of Ly49A and Ly49C receptors on Jurkat T cell transfectants with those found on normal NK/NK1.1⁺ T cells.

Selected Jurkat T cell clones expressing different levels of Ly49A or Ly49C receptors and BALB/c and C57BL/6 nylon wool nonadherent (NWN) spleen cells depleted of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were stained with YE1/32 (anti-Ly49A) or 4LO3311 (anti-Ly49C) biotinylated mAbs and streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) conjugate. YE1/32 mAb was used in this experiment because A1 mAb, used elsewhere in the paper for the characterization of Ly49A transfectants, detects a polymorphic epitope not expressed in BALB/c mice. The mean \pm SD MFI values measured on BALB/c and C57BL/6 NWN CD4⁺CD8⁻ spleen cells in 4 different experiments were respectively 49.7 ± 4.0 and 99.8 ± 14.2 for Ly49A and 81.1 ± 4.0 and 7.5 ± 0.2 for Ly49C.

ANNEXE D

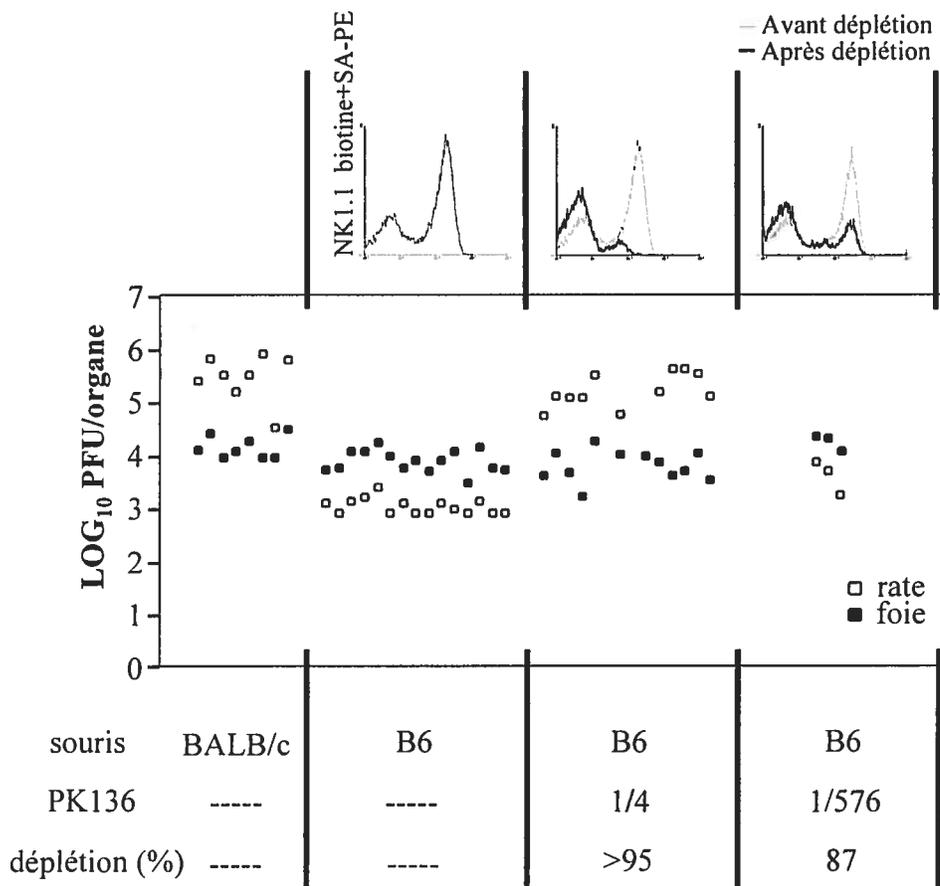


Figure 5 : Corrélation entre l'efficacité de déplétion des cellules NK1.1⁺ et la susceptibilité au MCMV de souris C57BL/6.

Des souris résistantes (B6) ont été injectées avec différentes quantités d'ascite de PK136, deux jours avant d'être infectées avec 2×10^3 p.f.u. de la souche Smith du MCMV. Deux jours après l'épreuve virale, les rates ont été récoltées. Une moitié de la rate était utilisée afin de procéder à la purification des cellules NK qui étaient ensuite marquées à l'aide de l'AcMo PK136 couplé à un fluorochrome et ce, afin de pouvoir évaluer le taux de déplétion atteint par cytométrie en flux. L'autre moitié de la rate et le foie étaient mis en culture en présence de fibroblastes afin d'établir le titre viral des souris et ce, afin d'établir leur phénotype de résistance. Les titres viraux spléniques et hépatiques de la souris susceptible (BALB/c) étaient utilisés comme témoins. **La portion du haut** illustre les résultats de cytométrie en flux; les cellules NK provenant des souris non traitées (traits pointillés) et traitées par l'AcMo PK136 (traits pleins) sont illustrés. Des groupes de 3 à 11 souris ont été utilisés selon la dilution. **La portion centrale** illustre les titres viraux (Log_{10} PFU/organe) spléniques (carrés vides) et hépatiques (carrés pleins) obtenus pour les différentes souris traitées. **La portion du bas** comprend les informations concernant le type des souris traitées, la quantité d'AcMo PK136 (anti-NK1.1) injectée (dilutions sériées d'ascite) et le pourcentage de déplétion atteint (%). P.f.u, «plaque-forming unit». Résultats non publiés.

ANNEXE E

Publications

A. Chalifour, J. Roger, S. Lemieux and P. Duplay. Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with TCR-mediated activation. *En révision par le comité d'Immunology, novembre 2002.*

J. Roger, A. Chalifour, S. Lemieux and P. Duplay. 2001. Cutting edge : Ly49A inhibits TCR/CD3-induced apoptosis and IL-2 secretion. *Journal of Immunology* 167; 6-10.

C. Depatie*, A. Chalifour*, C. Paré, S.-H. Lee, S. Lemieux and S.M. Vidal. 1999. Assessment of *Cmv1* candidates by genetic mapping and *in vivo* antibody depletion of NK cell subsets. *International Immunology* 11(9); 1541-51.

* ont contribué de façon équivalente

ANNEXE F

Communications

A. Chalifour, J. Roger, S. Lemieux and P. Duplay. Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with TCR-mediated activation. The 18th International Natural Killer Cell Workshop, The 6th Annual Meeting of the Society for Natural Immunity, Presqu'île de Giens, France, May 5-9, 2000.

D. Macina, A. Chalifour, S. Lemieux et S.M. Vidal. Analyse phénotypique des cellules spléniques impliquées dans la résistance à MCMV dans la souris BXD8/Ty. 67^{ème} Congrès de l'ACFAS, Ottawa, Canada. 10-14 Mai, 1999.

C. Depatie*, A. Chalifour*, P.Bérubé, S. Lemieux and S.M. Vidal. Testing *Cmv1* candidates : *in vivo* antibody depletions of Ly-49 Natural Killer cell receptors during MCMV infection. Canadian Genetic Diseases Network, St-Sauveur, Canada, May 12-15, 1998.

A. Chalifour*, C. Depatie*, S.M. Vidal and S. Lemieux. Are natural killer (NK) cells expressing particular receptors playing a role in resistance to MCMV? Canadian Society of Immunology Spring Meeting, Ste-Adèle, Canada, March 13-16, 1998.

A. Chalifour, Y. Lusignan, P. Gosselin et S. Lemieux. Propriétés du récepteur Ly-49G des cellules NK murines. 34^{ème} Congrès du "Club de Recherches Cliniques du Québec", Trois-Rivières, Canada, 16-18 Octobre, 1997.

C. Depatie*, A. Chalifour*, S. Lemieux and S.M. Vidal. Investigation of the Ly49A, Ly49C and Ly49G2 natural killer cell receptors as candidates for the natural resistance locus *Cmv1*. 11th International Mouse Genome Conference, St-Petersburg, FL, October 12-16, 1997.

* ont contribué de façon équivalente

