

Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique
INRS-Institut Armand-Frappier

Régulation de l'expression et analyse fonctionnelle de Ly49B, un récepteur de type NK, sur des macrophages activés

par

Ronan ROUXEL

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

Composition du jury d'évaluation :

- Examineur externe : Ali Ahmad, Centre de recherche CHU Ste-Justine, Université de Montréal
- Évaluateur interne et président du jury : Denis Girard, INRS-IAF
- Directrice de recherche : Suzanne Lemieux, INRS-IAF
- Codirecteur de recherche : Alain Lamarre, INRS-IAF

SOMMAIRE

Chez la souris, l'activité fonctionnelle des cellules NK et NKT est régulée par un équilibre de signaux provenant de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Plusieurs de ces récepteurs appartiennent à la famille Ly49, des protéines transmembranaires de type II, majoritairement inhibitrices, et apparentées aux lectines de type C. Dans cette famille, le récepteur Ly49B se distingue singulièrement. D'une part, le gène codant pour ce récepteur est très éloigné (750 kb) des autres membres de sa famille, tous regroupés au sein du complexe des gènes NK dans une région dont la taille varie de 300 à 600 kb selon les souches de souris. D'autre part, au plan structural, le récepteur Ly49B est celui qui présente la plus faible homologie (~70%) avec les autres récepteurs Ly49. La majorité des différences se situent dans la portion extracellulaire du récepteur, surtout dans le domaine de reconnaissance des sucres (le CRD), site principal de liaison de ces récepteurs à leurs ligands qui sont principalement des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité. Le récepteur Ly49B possède en outre une extension peptidique distinctive d'une vingtaine d'acides aminés à son extrémité C-terminale.

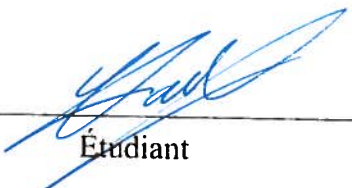
Suite à la production d'un anticorps monoclonal spécifique au récepteur Ly49B, notre laboratoire a pu élucider certaines caractéristiques de ce récepteur. Ainsi, le récepteur Ly49B n'est pas exprimé constitutivement par les cellules NK et NKT. Par ailleurs, il est exprimé sur des cellules de la lignée myéloïde (macrophages et polynucléaires neutrophiles). L'expression du récepteur Ly49B sur les macrophages est modulable suite à leur activation via différents récepteurs. Enfin, le potentiel inhibiteur du récepteur Ly49B, suggéré par la présence d'une séquence ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) dans son domaine cytoplasmique, a été confirmé par la démonstration que le récepteur phosphorylé était capable de recruter la phosphatase intracellulaire SHP-1. La distribution cellulaire particulière du récepteur Ly49B, le caractère inductible de son expression ainsi que sa capacité à recruter une phosphatase intracellulaire, suggèrent qu'il puisse exercer un rôle régulateur dans les macrophages activés.

Les expérimentations exposées dans ce mémoire avaient pour objectifs de mieux cerner les conditions qui prévalent à la modulation de l'expression du récepteur Ly49B, d'évaluer son potentiel inhibiteur dans un contexte de co-engagement avec un récepteur d'activation et de comparer sa localisation intracellulaire dans les cellules activées et non

activées. En utilisant comme modèle les macrophages de la lignée RAW264.7, nous avons d'abord évalué les effets dose-réponse de l'IFN- γ , du LPS et du Poly(I:C) sur l'expression du récepteur Ly49B. Nous avons ainsi pu observer que les doses seuil de modulation de même que les valeurs d'expression maximale du récepteur variaient pour chaque type d'activation. Nous avons également étudié la modulation de l'expression du récepteur Ly49B suite à l'activation des macrophages via d'autres TLRs ou par des cytokines pro- ou anti-inflammatoires. Dans le cas de l'activation via TLR3 et TLR4, nous avons établi le rôle intermédiaire que joue l'IFN- β dans l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B. Enfin, nous avons déterminé que différents inducteurs pouvaient avoir des effets synergiques ou antagonistes sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B à la surface des macrophages.

Pour évaluer le potentiel inhibiteur du récepteur Ly49B, nous avons mis en place un modèle de co-engagement du récepteur Ly49B et d'un récepteur activateur avec des anticorps immobilisés. L'engagement du récepteur Ly49B dans ces conditions n'a pas eu d'effet sur la production d'oxyde nitrique attribuable à l'engagement de CD40. L'engagement du récepteur Ly49B par des anticorps immobilisés n'entraîne pas non plus de modifications dans la structure du cytosquelette des macrophages activés ou non activés. Nous avons finalement étudié la localisation du récepteur Ly49B dans les macrophages activés et non activés afin de déterminer si sa distribution pouvait ou non être prédictive d'une implication dans une fonction. L'expression accrue du récepteur Ly49B dans les cellules activées est vraisemblablement attribuable à une synthèse *de novo* de la protéine et la distribution diffuse du récepteur dans toute la cellule ne fournit aucune indication particulière qui puisse aider à l'identification de la ou des fonctions dont il pourrait assurer la régulation.

Les études réalisées durant cette maîtrise ont permis d'appréhender la finesse de la régulation de l'expression du récepteur Ly49B, un phénomène non documenté pour les autres récepteurs Ly49. Les données colligées supportent l'hypothèse que le récepteur Ly49B contribue à la régulation du macrophage en situation d'inflammation.



Étudiant



Directrice de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dre Suzanne Lemieux pour m'avoir permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire ainsi que pour l'aide et l'encadrement qu'elle m'a apportés.

Ensuite, je remercie mon codirecteur de maîtrise, le Dr Alain Lamarre ainsi que les Dr Albert Descoteaux et Éric Déziel pour leur aide et leurs conseils. Merci également à Marcel Desrosiers pour son aide précieuse en cytométrie en flux.

Je remercie énormément Soizic, ma compagne, pour sa patience et son soutien moral omniprésent, ainsi que mes deux familles, la vraie et celle que le Québec m'a offerte.

Finalement, un grand merci à toutes les personnes, étudiants, techniciens, agents de recherche et professeurs que j'ai côtoyés à l'institut. Leur assistance et leur présence ont été grandement appréciées.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
I - INTRODUCTION	1
II- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1 - Les récepteurs des cellules NK impliqués dans la tolérance au soi et la surveillance naturelle contre les infections et les tumeurs.....	3
1.1 - Introduction.....	3
1.2 - Le complexe des gènes NK.....	3
1.3 - Les récepteurs apparentés à la superfamille des lectines de type C.....	6
1.3.1 - La famille des récepteurs NKR-P1	6
1.3.2 - Les récepteurs de la famille CD94/NKG2	7
1.3.3 - Le récepteur NKG2D	8
1.3.4 - Les récepteurs Ly49	8
1.4 - Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines	11
1.4.1 - Les récepteurs KIR.....	11
1.4.2 - Les récepteurs de la famille ILT	11
2 - Les récepteurs Ly49 murins.....	13
2.1 - Variabilité des gènes Ly49 selon les souches murines	13
2.2 - Évolution de la famille des gènes <i>Ly49</i>	15
2.3 - Classification des récepteurs Ly49 murins	19
2.4 - Les ligands des récepteurs Ly49 murins	21
2.4.1 - Les CMH de classe I	21
2.4.2 - Un récepteur particulier : le Ly49H	22
2.5 - Acquisition et expression des récepteurs Ly49 au cours du développement des cellules NK.....	23
2.6 - Modulation des propriétés fonctionnelles des cellules NK.....	25
2.7 - Expression et fonctions des récepteurs Ly49 sur des populations cellulaires autres que les cellules NK	28

3 - Les macrophages.....	30
3.1 - Propriétés des macrophages.....	31
3.2 - La production de NO comme témoin de l'activation des macrophages.....	33
3.3 - Les différentes voies d'activation des macrophages.....	34
3.3.1 - Activation via les Toll-Like Receptors.....	36
3.3.1.1 - TLR1, TLR2 et TLR6.....	37
3.3.1.2 - TLR3.....	38
3.3.1.3 - TLR4.....	38
3.3.1.4 - TLR5.....	38
3.3.1.5 - TLR7 et TLR8.....	39
3.3.1.6 - TLR9.....	39
3.3.1.7 - TLR11.....	39
3.3.2 - Signalisation via les TLRs.....	40
3.3.2.1 -La voie dépendante de MyD88.....	43
3.3.2.2 - La voie indépendante de MyD88 mais dépendante de TRIF.....	44
3.3.3 - Activation par les interférons.....	44
3.3.3.1 - L'IFN- γ	45
3.3.3.2 - L'IFN- β	46
3.3.4 - Activation par d'autres cytokines.....	47
3.3.4.1 - Le TNF- α	47
3.3.4.2 - L'IL-4.....	48
3.3.4.3 - L'IL-10.....	48
3.3.5 - Effets synergiques.....	50
3.4 - Les lignées de macrophages.....	50
4 - Le récepteur Ly49B.....	51
5 - Objectifs du projet.....	53
III- MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	54
1 - Maintien en culture de la lignée RAW 264.7.....	54
2 - Agonistes, cytokines et anticorps.....	54
3 - Culture des hybridomes et production des anticorps.....	55
4 - Biotinylation des anticorps.....	56
5 - Protocoles d'activation des macrophages.....	56
5.1 Par des cytokines ou des agonistes.....	56
5.2 Par des anticorps immobilisés.....	57
6 - Dosage de l'oxyde nitrique.....	59
7 - Cytométrie en flux.....	59
8 - Microscopie confocale.....	60

IV - RÉSULTATS	62
1- Modulation de l'expression du récepteur Ly49B à la surface des cellules RAW 264.7	62
1.1 - Modulation de l'expression du récepteur Ly49B par l'IFN- γ , le LPS et le Poly(I:C).....	65
1.2 - Modulation comparée de l'expression du récepteur Ly49B suite à l'activation des macrophages via différents TLRs	69
1.3 - Rôle de l'IFN- β dans la modulation de l'expression du récepteur Ly49B	72
1.3.1 - Effet direct de l'IFN- β sur la modulation du niveau d'expression du récepteur Ly49B	73
1.3.2 - Contribution de l'IFN- β autocrine à la modulation de l'expression du récepteur Ly49B induite lors de l'engagement de TLR4 et de TLR3	73
1.4 - Implication du TNF- α dans la modulation du niveau d'expression du récepteur Ly49B	78
1.5 - Effet synergique de l'IFN- γ et du LPS sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B	81
1.6 - Modulation de l'expression du récepteur Ly49B dans le cas d'une activation alternative par l'IL-4	83
1.7 - Modulation de l'expression du récepteur Ly49B par l'IL-10	85
2 - Effet de l'engagement du récepteur Ly49B par des anticorps immobilisés	87
2.1 - Effet du co-engagement du récepteur Ly49B sur la production de NO par des cellules RAW 264.7 activées via CD40	88
2.2 - Effet de l'engagement du récepteur Ly49B sur la réorganisation du cytosquelette.....	97
3 - Localisation du récepteur Ly49B dans les cellules RAW 264.7	98
V - DISCUSSION	102
VI - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	117
VII - RÉFÉRENCES.....	119

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure 1:	Illustration schématique du complexe des gènes NK (NKC) de la sourisp 4-5
Figure 2:	Arbre phylogénétique de la famille des gènes <i>Ly49</i> de la souris, du rat, du babouin et de l'humainp 16-17
Figure 3:	Voies de signalisation des TLRs.....p 41-42
Figure 4:	Protocole d'activation des macrophages par co-engagement de récepteurs activateurs et inhibiteurs par des anticorps immobilisés.....p 58
Figure 5:	Méthode d'évaluation de la modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> à la surface des macrophages de la lignée RAW 264.7.....p 64
Figure 6:	Modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> par l'IFN- γp 66
Figure 7:	Modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> par le LPS.....p 67
Figure 8:	Modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> par le Poly(I:C).....p 68
Figure 9:	Modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> par l'activation via différents TLRs.....p 71
Figure 10:	Modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> par l'IFN- βp 74
Figure 11:	Contribution de l'IFN- β autocrine à la modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> par le LPS.....p 76
Figure 12:	Contribution de l'IFN- β autocrine à la modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> par le Poly(I:C).....p 77
Figure 13:	Modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> en présence de TNF- α et/ou d' IFN- γp 80
Figure 14:	Effet de la stimulation combinée par le LPS et l'IFN- γ sur la modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i>p 82
Figure 15:	Modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> en présence d'IL-4 et/ou d' IFN- γp 84
Figure 16:	Modulation de l'expression du récepteur <i>Ly49B</i> en présence d'IL-10 et/ou d' IFN- γ p 86

Figure 17 :	Production de NO par des cellules RAW 264.7 cultivées en présence d'IFN- γ puis mises en contact avec des anticorps anti-CD40 immobilisés.....	p 91
Figure 18:	Effet de l'engagement du récepteur Ly49B par des anticorps immobilisés (3LP218 et isotype) sur la production de NO induite via CD40.....	p 93
Figure 19:	Effet de l'engagement du récepteur Ly49B par des anticorps immobilisés (3LP218 ou isotype) sur la production de NO induite via CD40.....	p 95
Figure 20:	Localisation du récepteur Ly49B dans des cellules RAW 264.7 non stimulées.....	p 96
Figure 21 :	Localisation du récepteur Ly49B dans des cellules RAW 264.7 cultivées en présence de 100 U/ml d'IFN- γ	p 100
Tableau 1 :	Augmentation de la production de NO suite à l'engagement de CD40 sur des cellules RAW 264.7 cultivées en présence d'IFN- γ	p 101

LISTE DES ABRÉVIATIONS

15dPGJ2 : 15-deoxy- Δ^{12-14} prostaglandin J₂
ADN: Acide désoxyribonucléique
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ATCC : American Type Culture Collection
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes
CRD: carbohydrate-recognition domain
DAP-10 : DNAX-activation protein 10
DAP-12 : DNAX-activation protein 12
DMEMc: DMEM complet
DO: densité optique
Fc: Fragment constant
FE: Facteur d'expression
GAS : Gamma-Interferon Activation
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage-Colony stimulating factor
HA : hémagglutinine
HMGB1: High mobility group protein 1
IFN: Interféron
IFNAR : Interferon alpha receptor
IFNGR : récepteur de l'IFN- γ
IKK : I κ B kinase
IL: Interleukine
IL-10R : récepteur de l'IL-10
ILT : Immuoglobulin-like transcript
iNOS: inductible NO synthase
ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
kb: kilobase
LBP : Lipopolysaccharide Binding Protein

LIR : Leucocyte Ig-like receptor
LPS : Lipopolysaccharide de *Escherichia coli*
MCMV : mouse cytomegalovirus
M-CSF : Macrophage-Colony stimulating factor
MIR : monocyte/macrophage Ig-like receptor
NKC : complexe des gènes NK
NKR-P1 : NK cell receptor protein 1
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PI₃ Kinase : Phosphoinositide 3-Kinase
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
SAPE-Cy5: Streptavidin Phycoerythrin Cy5
STAT : signal transducer and activator of transcription
SVF : Serum de veau fœtal
TCR : T-Cell Receptor
TIR : Toll-interleukin 1 receptor
TIRAP : TIR domain containing adaptor protein
TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNF-R : Tumor Necrosis Factor- Receptor
TRAF : TNF-Receptor-associated factor
TREM : Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells
U/ml : nombre d'unité effective par millilitre
UN : Unité neutralisante

I - INTRODUCTION

Depuis la première caractérisation fonctionnelle d'un de ses membres au début des années 1990, les récepteurs de la famille Ly49 n'ont cessé de surprendre. Ces récepteurs sont principalement exprimés par les cellules NK dont ils assurent le maintien de l'homéostasie de même que la régulation de leurs propriétés cytotoxiques face aux cellules du soi et de leur capacité à sécréter des cytokines et des chimiokines, une fonction déterminante dans la régulation de la différenciation, de la migration et de l'activation des autres cellules du système immunitaire. Des récepteurs Ly49 ont cependant été identifiés sur d'autres populations cellulaires telles que des lymphocytes T $CD8\alpha\beta^+TCR\alpha\beta^+$, des lymphocytes T $TCR\gamma\delta^+$, des cellules NKT, des lymphocytes B immatures, des cellules dendritiques plasmacytoïdes, des polynucléaires neutrophiles et des monocytes-macrophages. L'expression de certains récepteurs Ly49 est limitée à un nombre restreint de ces différents types cellulaires, c'est notamment le cas du récepteur Ly49B qui fait l'objet de ce mémoire.

Les récepteurs Ly49 ont surtout été caractérisés chez les rongeurs chez qui ont été identifiés un grand nombre de gènes dont plusieurs sont polymorphes. Chez la souris, la famille Ly49 compte une vingtaine de membres qui présentent un haut niveau d'homologie. Ils ont été nommés en ordre alphabétique (Ly49A à Ly49Y) selon l'ordre chronologique de leur découverte. L'analyse comparée des séquences nucléotidiques des gènes *Ly49* et de leur localisation chromosomique chez différentes souches de souris a récemment permis de conclure que des gènes à qui ont été attribués des noms distincts seraient vraisemblablement des allèles de gènes préalablement identifiés chez des souches différentes. La taille réelle de la famille Ly49 demeure donc encore un peu floue. Non seulement toutes les souches de souris n'expriment pas la totalité des gènes *Ly49*, mais chez une souche donnée, différentes populations de cellules expriment des ensembles distincts de récepteurs Ly49. Pour certains des récepteurs Ly49, des variations de niveau d'expression ont été rapportées, notamment selon l'état de maturation des cellules, leur localisation anatomique, l'état de santé de l'animal, la présence ou l'absence d'un ligand sur les cellules avoisinantes (reconnaissance *trans*) ou sur les cellules qui expriment elles-mêmes ces récepteurs (reconnaissance *cis*).

En raison du haut degré d'homologie qui existe entre les membres de la famille, l'étude individuelle des récepteurs Ly49 n'est pas facile à réaliser car peu d'anticorps monoclonaux se lient sélectivement à un seul récepteur. De tels outils sont pourtant essentiels, notamment pour étudier la distribution cellulaire et les propriétés fonctionnelles de chacun de ces récepteurs.

Tel qu'indiqué par son nom, le récepteur Ly49B est le second de cette famille dont l'existence a été découverte. Bien que le clonage et le séquençage d'un ADNc aient dès le départ identifié certaines particularités du gène *Ly49b*, la caractérisation de son produit n'a absolument pas progressé pendant toute une décennie. Grâce à la production d'un anticorps monoclonal spécifique au récepteur Ly49B, notre laboratoire a pu démontrer récemment que la distribution cellulaire de ce récepteur était bien différente de celle de la majorité des autres membres de la famille Ly49, qu'il avait un potentiel inhibiteur confirmé par sa capacité à recruter une phosphatase cellulaire et surtout que son expression était modulable.

L'objectif principal de ce mémoire était de poursuivre cette caractérisation. Peu de récepteurs Ly49 étant ainsi modulables, il nous a paru pertinent de chercher à mieux définir les facteurs qui conditionnent l'expression du récepteur Ly49B à la surface de macrophages activés et de tenter d'en évaluer les conséquences.

Avant qu'il soit fait état de nos observations expérimentales, la revue bibliographique nous permettra de situer la famille des récepteurs Ly49 par rapport aux autres familles auxquelles elle s'apparente, au plan structural ou fonctionnel, puis de rappeler les principaux effets, sur le macrophage, des inducteurs que nous avons utilisés dans nos travaux.

II- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 - Les récepteurs des cellules NK impliqués dans la tolérance au soi et la surveillance naturelle contre les infections et les tumeurs

1.1 - Introduction

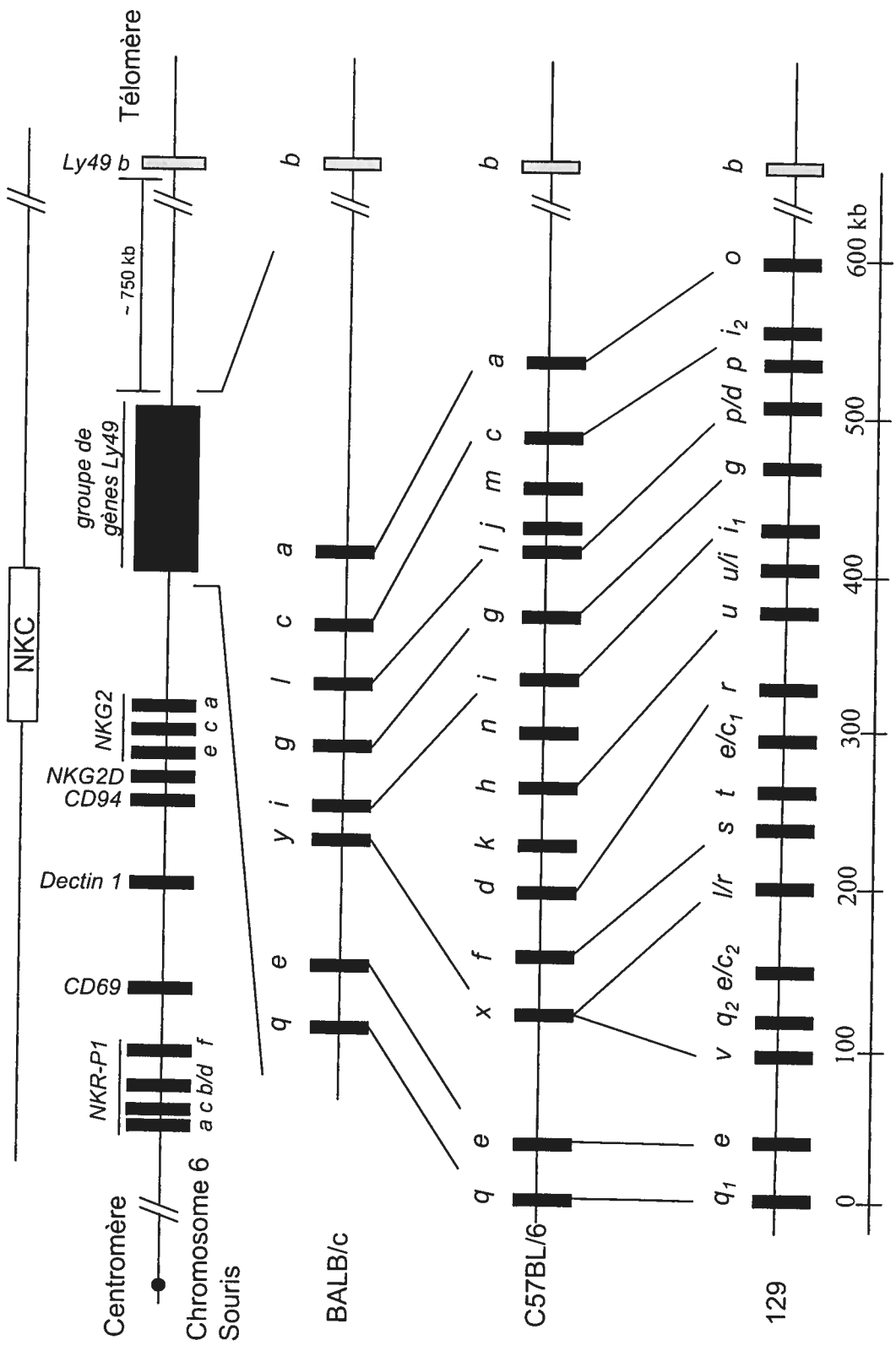
Plusieurs groupes de récepteurs contribuent à la tolérance au soi et à l'immunosurveillance contre les infections et les tumeurs assurées notamment par les cellules NK. Ils se distribuent en deux familles structurales distinctes soit les récepteurs apparentés aux lectines de type C dont font partie les familles NKR-P1, CD94/NKG2 et Ly49, et les récepteurs appartenant à la superfamille des immunoglobulines dont les principaux membres sont les KIR et les LIR (revue par Natarajan *et al.*, 2002).

1.2 - Le complexe des gènes NK

Le complexe des gènes NK (NKC) a été décrit pour la première fois en 1991 (Yokoyama *et al.*, 1991). Il s'agit d'une région chromosomique où sont localisés plusieurs groupes de gènes qui codent pour des récepteurs majoritairement exprimés sur les cellules NK. Chez la souris, le NKC est situé sur le chromosome 6; il contient notamment les gènes codant pour les récepteurs NKR-P1, CD69, CD94, NKG2 (A, C, D et E), ainsi que les récepteurs Ly49. Une représentation schématique du NKC mettant l'emphase sur les récepteurs Ly49 chez différentes souches de souris est présentée dans la figure 1. On y voit que la totalité des gènes *Ly49* est concentrée dans la région la plus télomérique du NKC dans une portion d'environ 1.4 Mb, le gène *Ly49b* étant éloigné des autres membres de sa famille de 750 kb vers le télomère (Brown *et al.*, 1997; Plougastel *et al.*, 2001; Takei *et al.*, 2001; Yokoyama et Plougastel 2003).

Figure 1: Illustration schématique du complexe des gènes NK (NKC) de la souris

Le complexe des gènes NK, exprimé sur le chromosome 6 de la souris, contient différentes familles de gènes (CD94/NKG2, NKR-P1, et Ly49) dont les produits sont exprimés sur les cellules NK. Les gènes de la famille Ly49 varient d'une souche de souris à l'autre. Le gène *Ly49b* est présent chez chacune des souches de souris dont le NKC a été analysé en détails et sa position est toujours excentrée à environ 750 kb en aval du groupe de gènes *Ly49*. Les traits qui relient les gènes des différentes souches représentent les allèles probables aux différents loci. (D'après Brown *et al.*, 1997; Takei *et al.*, 2001; Makrigiannis *et al.*, 2002; Wilhelm, Gagnier et Mager, 2002; Yokoyama et Plougastel, 2003; Proteau *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2005)



1.3 - Les récepteurs apparentés à la superfamille des lectines de type C

1.3.1 - La famille des récepteurs NKR-P1

Les récepteurs NKR-P1 (NK cell receptor protein 1) (CD161) forment une famille de récepteurs dont les structures sont très conservées entre le rat, la souris et l'humain. L'un de ces récepteurs, le récepteur NKR-P1C correspond à l'antigène NK1.1 qui a été très utilisé comme marqueur spécifique des cellules NK et NKT, surtout chez la souris C57BL/6 (B6) (Karlhofer et Yokoyama 1991). L'utilisation de l'anticorps PK136 anti-NK1.1 a permis la découverte d'un récepteur homologue inhibiteur chez les souches de souris Sw et SJL, le NKR-P1B (Carlyle *et al.*, 1999 ; Kung *et al.*, 1999) ainsi que son équivalent chez la lignée B6, le récepteur NKR-P1D (Plougastel *et al.*, 2001; Iizuka *et al.*, 2003). Aujourd'hui, on connaît six gènes codant pour des récepteurs de la famille NKR-P1, certains ont des orthologues chez d'autres espèces et présentent un très faible polymorphisme au niveau intra-spécifique (Plougastel et Yokoyama 2006). Trois de ces gènes codent pour des récepteurs activateurs : *NKR-P1 a*, *c* et *f* qui possèdent un acide aminé arginine chargé dans leur domaine transmembranaire leur permettant de lier et d'activer la protéine FcR γ qui contient des séquences consensus ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (Arase *et al.*, 1997). Les gènes *NKR-P1 b* et *d* codent pour des récepteurs inhibiteurs qui possèdent une séquence consensus ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif : I/S/T/LxYxxL/V) dans leur domaine intracellulaire. Leur ligand est la protéine Ocil/Clr-b, une protéine apparentée aux lectines de type C, exprimée sur les cellules myéloïdes (Pyz *et al.*, 2006) et régulée à la baisse dans certaines tumeurs (Carlyle *et al.*, 2004). Il a été démontré que l'engagement du récepteur NKR-P1C avec l'anticorps spécifique PK136 permettait l'initiation de l'activité cytotoxique des cellules NK (Karlhofer et Yokoyama 1991). Étant donné la présence de séquences ITIM dans leur domaine cytoplasmique ainsi que leur capacité à recruter la protéine SHP-1, il semblerait que les récepteurs NKR-P1B et D jouent un rôle dans l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK (Carlyle *et al.*, 1999; Ljutic *et al.*, 2005).

1.3.2 - Les récepteurs de la famille CD94/NKG2

Les récepteurs hétérodimériques de la famille CD94/NKG2 sont présents chez l'humain et la souris. Un seul gène *CD94* et quatre gènes *NKG2* ont été isolés chez la souris (*NKG2a, c, d* et *e*). Il existe un gène *NKG2f* chez l'humain et la protéine NKG2B correspond à une forme épissée du gène *NKG2a*. La forte homologie structurale de ces protéines entre l'humain et la souris et la conservation de l'ordre des gènes au niveau génomique laissent supposer que cette famille de récepteurs était déjà présente chez l'ancêtre commun de ces deux espèces; il s'agirait donc d'une famille de récepteurs très ancienne et très conservée dans le temps (revue par Takei *et al.*, 2001). Le complexe CD94/NKG2A forme un récepteur inhibiteur hétérodimérique qui possède deux séquences ITIM dans la portion cytoplasmique de la protéine NKG2A (Lazetic *et al.*, 1996). Les récepteurs CD94/NKG2C et CD94/NKG2E ne possèdent pas de domaine ITIM, mais ils ont la possibilité de s'associer par interaction ionique à la protéine homodimérique DAP12 (DNAX-activating protein of 12kD) dont chaque chaîne polypeptidique possède une séquence ITAM dans sa portion cytoplasmique (Lanier *et al.*, 1998).

Les ligands des récepteurs de type CD94/NKG2 sont des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) non classiques, soit HLA-E chez l'humain et Qa1^b chez la souris (Vance *et al.*, 1998; Vance, Jamieson et Raullet 1999). Les récepteurs CD94/NKG2 inhibiteurs et activateurs ont les mêmes ligands. Cependant, Takei et collaborateurs ont rapporté que, chez la souris, la fréquence d'expression de CD94/NKG2A (inhibiteur) était nettement supérieure à celle des récepteurs activateurs sur les cellules NK de la moelle osseuse et de la rate (Takei *et al.*, 2001). Ceci favorise vraisemblablement le maintien des cellules NK à l'état d'inactif tant que les cellules environnantes expriment le ligand approprié. La régulation de l'expression des récepteurs de surface pourrait donc être un élément clé du maintien de l'homéostasie des cellules NK.

Peu de choses sont connues quant au rôle de la protéine CD94, mais il semblerait qu'il s'agisse d'une protéine chaperonne. On sait qu'il est impossible de forcer la dimérisation de deux sous-unités NKG2 et que la plupart des protéines de la famille NKG2 ne peuvent être exprimées à la surface de la cellule NK que lorsqu'elles sont reliées par des ponts disulfures à la protéine CD94 (revue par Lanier 1998). La seule exception est la protéine NKG2D.

1.3.3 - Le récepteur NKG2D

Le récepteur NKG2D est un cas à part : il a peu d'homologie avec les chaînes polypeptidiques codées par les autres gènes du groupe NKG2 et il ne forme pas de complexe avec la protéine CD94 (Raulet 2003). Il s'exprime sous forme d'un homodimère associé aux protéines adaptatrices DAP10 ou DAP12 (Vivier, Nunes et Vely 2004). Il s'agit d'un récepteur activateur de forte puissance dont l'action est perceptible souvent même lorsque des récepteurs Ly49 inhibiteurs sont engagés simultanément (Malarkannan 2006). Le récepteur NKG2D reconnaît des protéines de stress cellulaire de structure apparentée aux CMH de classe I (ULBP, MICA/B chez l'homme et H60, Rae-1 et MULT-1 chez la souris) (revue par Raulet 2003). Le récepteur NKG2D et les molécules adaptatrices DAP10 et DAP12 sont aussi exprimés chez le porc (Yim *et al.*, 2000; Yim *et al.*, 2001) et chez les bovins (Birch et Ellis 2007).

1.3.4 - Les récepteurs Ly49

Les récepteurs Ly49 sont exprimés à la surface de nombreuses cellules du système immunitaire, surtout des cellules NK, mais certains d'entre eux sont exprimés sur des cellules NKT, des lymphocytes T CD8⁺, des lymphocytes B, des cellules dendritiques et des macrophages. Les récepteurs Ly49 sont exprimés et fonctionnels chez la souris, le rat, et d'autres espèces animales (Hao et Nei 2004). Les humains n'expriment pas de récepteurs Ly49 fonctionnels mais ils expriment un pseudogène, le *Ly49l* (Westgaard *et al.*, 1998).

Les récepteurs Ly49 ont la capacité de reconnaître des molécules du CMH-I. L'engagement des récepteurs Ly49 avec leurs ligands a comme conséquence de moduler l'activité des cellules qui les expriment. Certains des récepteurs Ly49 permettent, par exemple, aux cellules NK de distinguer les cellules saines de celles dont l'expression des molécules du CMH-I est réduite comme c'est souvent le cas suite à une infection virale ou au cours du développement des cellules tumorales.

Les récepteurs Ly49 sont des protéines homodimériques de type II que l'on dit apparentés aux lectines de type C, mais à la différence de ce type de lectines, les récepteurs Ly49 peuvent reconnaître leurs ligands en l'absence de Ca^{2+} (Brennan *et al.*, 1995). La masse moléculaire de chacune des sous-unités des récepteurs Ly49 varie de 39 à 65 kDa et elles sont reliées entre elles par plusieurs ponts disulfures.

La portion extracellulaire des récepteurs Ly49 comprend une tige et un domaine de reconnaissance des sucres (CRD), principal site de reconnaissance des ligands et le principal site d'hétérogénéité entre les différents récepteurs Ly49 (Wong *et al.*, 1991; Anderson, Ortaldo et McVicar 2001). Les récepteurs Ly49 présentent de nombreux sites potentiels de N-glycosylation, surtout au niveau de leur CRD; la présence de chaînes de carbone à ce niveau fait varier leur masse moléculaire. Le CRD est relié à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une portion peptidique d'environ 70 acides aminés agencée en hélices- α . Cette tige permet également à certains récepteurs d'adopter une conformation droite ou repliée impliquée dans la reconnaissance en *cis* ou *trans* des ligands (Doucey *et al.*, 2004; Dam *et al.*, 2006). Le domaine transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés est majoritairement composé d'acides aminés hydrophobes. Cependant, les récepteurs Ly49 activateurs possèdent un acide aminé chargé positivement dans cette portion qui leur permet de s'associer à la protéine DAP12 par opposition de charges (Smith *et al.*, 1998). L'engagement du récepteur Ly49 auquel la protéine DAP12 est associée va entraîner la phosphorylation des tyrosines de son domaine ITAM cytoplasmique et permettre ainsi le recrutement et l'activation de kinases de la famille *Src*, *Syk* et *Zap-70* (Smith *et al.*, 1998). Les tyrosines kinases ainsi activées vont ensuite

initier une cascade d'événements de signalisation qui va conduire à l'activation de la cellule. Dans le cas des cellules NK, les effets de l'engagement des récepteurs Ly49 activateurs peuvent être amplifiés par l'engagement simultané d'autres récepteurs membranaires tels que les récepteurs pour les cytokines IL-12 et IL-18 (Ortaldo et Young 2003). Les domaines intracellulaires sont très peu polymorphes. On note la présence d'un domaine ITIM dans chaque portion cytoplasmique des récepteurs Ly49 inhibiteurs (McVicar et Burshtyn 2001).

Lors de l'engagement du récepteur avec son ligand, les résidus tyrosine présents dans les domaines ITIM de l'homodimère sont phosphorylés, ce qui permet le recrutement et l'activation de phosphatases comme SHP-1 et parfois SHP-2. Une fois les phosphatases activées, celles-ci vont pouvoir aller bloquer la transmission de signaux d'activation engendrés par l'engagement d'un récepteur activateur de type Ly49, CD94/NKG2, NKG2D, NKR-P1, CD16 ou bien d'autres avec un de leurs ligands (revue par Lanier 2003). On sait par exemple que l'engagement de récepteurs Ly49 inhibiteurs à la surface des cellules NK peut entraîner le blocage de l'activité cytotoxique et de la production de cytokines par ces cellules (Karlhofer, Ribaldo et Yokoyama 1992; Ortaldo *et al.*, 1997). À titre d'exemple, Kim et Yokoyama ont démontré que l'engagement du récepteur activateur NK1.1 avec des anticorps agonistes entraînait la synthèse de TNF- α , d'IFN- γ et de GM-CSF par des cellules NK. Cependant, cette activation était annulée lorsque le récepteur inhibiteur Ly49A était engagé lui aussi avec un anticorps agoniste (Kim et Yokoyama 1998).

En réalité, le rôle que jouent les récepteurs Ly49 est beaucoup plus complexe et dépend de la résultante d'une foule d'interactions récepteurs-ligands. Des récepteurs Ly49 activateurs ne possédant pas de domaine ITIM, y sont impliqués de même que plusieurs autres récepteurs activateurs. Nous y reviendrons subséquemment.

1.4 - Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines

1.4.1 - Les récepteurs KIR

Les cellules NK humaines n'expriment pas de récepteurs fonctionnels de type Ly49. En effet, un seul gène *Ly49l* a été trouvé, mais un codon stop précoce empêche sa transcription (Westgaard *et al*, 1998). C'est une autre famille de récepteurs, les récepteurs *KIR* (Killer Immunoglobulin-like Receptor) qui, sur les cellules NK humaines, assurent principalement les fonctions analogues à celles des récepteurs Ly49. Chez l'humain, la famille des gènes *KIR* est composée de 15 gènes et 2 pseudogènes qui sont étroitement liés sur le chromosome 19. Le nombre de gènes *KIR* dans le génome varie d'un individu à l'autre (revue par Moretta *et al.*, 2006). La multiplicité de ces gènes, leur forte homologie ainsi que leur proximité dans le génome sont source de fréquentes recombinaisons génomiques et sont la cause d'une rapide évolution de ces gènes. Les récepteurs KIR sont des protéines transmembranaires de type I avec deux ou trois domaines immunoglobulines dans leur portion extracellulaire (revue par Lanier 2005; O'Connor, Hart et Gardiner 2006). Tout comme les récepteurs CD94/NKG2 et Ly49, les récepteurs KIR peuvent eux aussi être de deux types, inhibiteur (présence d'un ITIM dans leur domaine intracellulaire) ou activateur (possibilité d'association avec la protéine DAP12). Outre les récepteurs KIR, il existe chez l'humain une foule d'autres récepteurs qui participent également à la modulation de l'activité des cellules NK notamment le récepteur NKR-P1A, le récepteur CD16, la famille de récepteurs CD94/NKG2, les récepteurs NCR et les récepteurs ILT-1 et ILT-2 dont la distribution particulière est abordée dans la prochaine section (O'Connor, Hart et Gardiner 2006).

1.4.2 - Les récepteurs de la famille ILT

Les récepteurs de la famille ILT (Immunoglobulin-like transcript) sont également connus sous le nom de monocyte/macrophage Ig-like receptor (MIR) ou leucocyte Ig-like receptor (LIR). Les récepteurs ILT sont reliés, d'un point de vue génétique, structural et fonctionnel, aux récepteurs KIR et présentent également une similitude avec les

récepteurs murin PIR-A et PIR-B. Cependant, la distribution des récepteurs de cette famille n'est pas restreinte aux cellules NK puisqu'ils sont aussi exprimés par certaines populations, de lymphocytes T, de lymphocytes B ainsi que par des cellules dendritiques et des macrophages. Il existe deux catégories de récepteurs ILT, les récepteurs inhibiteurs qui se distinguent par la présence d'une séquence ITIM dans leurs domaines intracellulaires (ILT-2 à 5 et ILT-8), et les récepteurs activateurs qui possèdent un acide aminé chargé positivement dans leur portion transmembranaire (ILT-1, ILT-6 et ILT-7). Les ligands des récepteurs ILT-1 et ILT-2 sont des molécules du CMH de classe I. Les récepteurs ILT-1 et ILT-2 sont exprimés à la fois sur les monocytes et sur les cellules NK où ils sont capables d'inhiber la cytotoxicité à médiation cellulaire induite par exemple par l'activation des récepteurs FC γ RIII. Les récepteurs ILT-3 et ILT-4 sont spécifiques aux cellules dendritiques, aux monocytes et aux macrophages. Les récepteurs inhibiteurs ILT-2, ILT-3 et ILT-4 assurent, sur les macrophages et les monocytes, les mêmes fonctions que ceux exprimés sur les cellules NK (Fanger, Borges et Cosman 1999; Cella *et al.*, 2000).

En bref, malgré leurs différences de structure, les familles de récepteurs NKR-P1, CD94/NKG2, Ly49, KIR et ILT partagent plusieurs points communs. Tout d'abord toutes ces familles présentent une grande diversité génétique tout en conservant une forte homologie entre leurs membres à cause des nombreuses duplications et conversions subies par leurs gènes au cours de l'évolution. Ensuite, les signaux que génère l'engagement de ces récepteurs avec leurs ligands sont transmis au noyau via l'activation de tyrosine-phosphatases ou de tyrosine-kinases. Cette activation implique notamment la phosphorylation sur tyrosine de séquences ITIM ou ITAM. Des récepteurs de chacune de ces familles sont exprimés sur les cellules NK et leurs fonctions y sont similaires, soit, mis à part les récepteurs NKR-P1, la modulation des propriétés fonctionnelles de ces cellules via la reconnaissance des CMH de classe I. Les récepteurs ILT ont un profil d'expression plus varié, notamment les récepteurs ILT-3 et ILT-4 qui sont spécifiques aux cellules d'origine myéloïde, mais leurs ligands connus sont également des CMH de classe I. Il existe donc des similitudes dans le processus de la reconnaissance du soi chez la souris et l'humain, et bien que les familles de récepteurs qui y participent soient différentes d'un point de vue structural, leurs mécanismes d'action sont comparables. (revue par Lanier 1998; Kane, Lavender et Ma 2004).

2 - Les récepteurs Ly49 murins

La découverte du premier récepteur Ly49, qui prendra ultérieurement le nom de Ly49A, remonte à près de 20 ans (Chan et Takei 1988; Yokoyama *et al.*, 1989). Les deux équipes qui en font alors la découverte sur des lymphomes T soupçonnent immédiatement que le gène Ly49 qu'ils ont cloné appartient à une famille multigénique (Chan et Takei 1989; Yokoyama *et al.*, 1990). Dès 1991, Wong et collaborateurs confirment cette hypothèse en rapportant la séquence complète de deux nouveaux ADN complémentaires (ADNc) dont la séquence prédite en acides aminés a une forte homologie avec le récepteur Ly49A (Wong *et al.*, 1991). Étrangement, alors que les récepteurs Ly49A et Ly49C ont depuis été bien caractérisés, au plan structural comme au niveau fonctionnel, le récepteur Ly49B n'a été que très peu étudié. On dénombre aujourd'hui environ une vingtaine de gènes dans la famille Ly49 et plusieurs allèles ont été identifiés pour certains d'entre eux (Proteau, Rousselle et Makrigiannis 2004). On peut s'attendre à ce que de nouveaux gènes soient découverts à mesure que progressera la caractérisation de la région du génome spécifique à cette famille chez de nouvelles souches de souris.

2.1 - Variabilité des gènes Ly49 selon les souches murines

Toutes les souches murines n'expriment pas la totalité des récepteurs Ly49 et certains gènes y sont à l'état de pseudogènes. Par exemple, on ne connaît toujours pas de produits des gènes *Ly49k* et *Ly49n* qui présentent un codon stop précoce chez la souris B6 et qui ne semblent pas avoir d'homologues chez les autres souches étudiées (McQueen *et al.*, 1998; Silver *et al.*, 2001; Makrigiannis *et al.*, 2002; Wilhelm, Gagnier et Mager 2002; Proteau, Rousselle et Makrigiannis 2004). En revanche, bien qu'aucun récepteur n'ait été détecté, il est possible que le gène *Ly49y* code pour une protéine fonctionnelle chez BALB/c alors que son homologue chez B6, le gène *Ly49x*, est considéré comme un pseudogène dû à la présence d'un codon stop précoce (Wilhelm, Gagnier et Mager 2002;

Proteau, Rousselle et Makrigiannis 2004; Anderson *et al.*, 2005). D'autre part, le récepteur Ly49L est exprimé par les souris CBA/J, C3H et BALB/c mais le gène *Ly49l* est non-codant chez la souris B6 (Proteau, Rousselle et Makrigiannis 2004). Enfin, le gène *Ly49m* présente lui aussi un codon stop précoce dans le génome de la souris B6 de telle sorte que le récepteur Ly49M n'est pas exprimé par cette souche murine. Cependant, l'absence de ce codon stop chez la souche NOD laisse croire, qu'une protéine Ly49M fonctionnelle puisse y être exprimée (Silver *et al.*, 2001). La séquence prédite en acides aminés de certains récepteurs activateurs et inhibiteurs présente une très forte homologie dans leur portion extracellulaire et ceux-ci reconnaissent les mêmes ligands. Il existerait donc plusieurs paires de récepteurs inhibiteurs/activateurs telles que Ly49O/D, Ly49I/U, Ly49C/H, Ly49G/W (revue par Anderson, Ortaldo et McVicar 2001). Cependant, il semble que cette règle ne s'applique que pour les groupes de récepteurs apparentés à Ly49A ou Ly49C (voir p.19 à la section 2.3). En effet, on ne connaît pas de récepteurs activateurs dont la structure ressemble à celles des récepteurs inhibiteurs Ly49B, Ly49E, Ly49F, Ly49S et Ly49Q (Kane, Silver et Hazes 2001). Chacun de ces récepteurs non-pairés semble avoir une distribution qui lui est propre. Le récepteur Ly49B est exprimé sur les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles (Perrée 2003), le récepteur Ly49E est spécifiquement exprimé sur les cellules NK fœtales (Van Beneden *et al.*, 2001) et le récepteur Ly49F est exprimé préférentiellement sur les cellules T CD8⁺ (Coles *et al.*, 2000). C'est probablement aussi le cas pour Ly49S puisque le gène qui code pour ce récepteur serait l'allèle 129 de *Ly49f* de B6 (Proteau, Rousselle et Makrigiannis 2004). Enfin, Ly49Q est exprimé sur des cellules myéloïdes (macrophages et cellules dendritiques) (Toyama-Sorimachi *et al.*, 2004; Toyama-Sorimachi *et al.*, 2005) et sur des cellules dendritiques plasmacytoïdes (Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005).

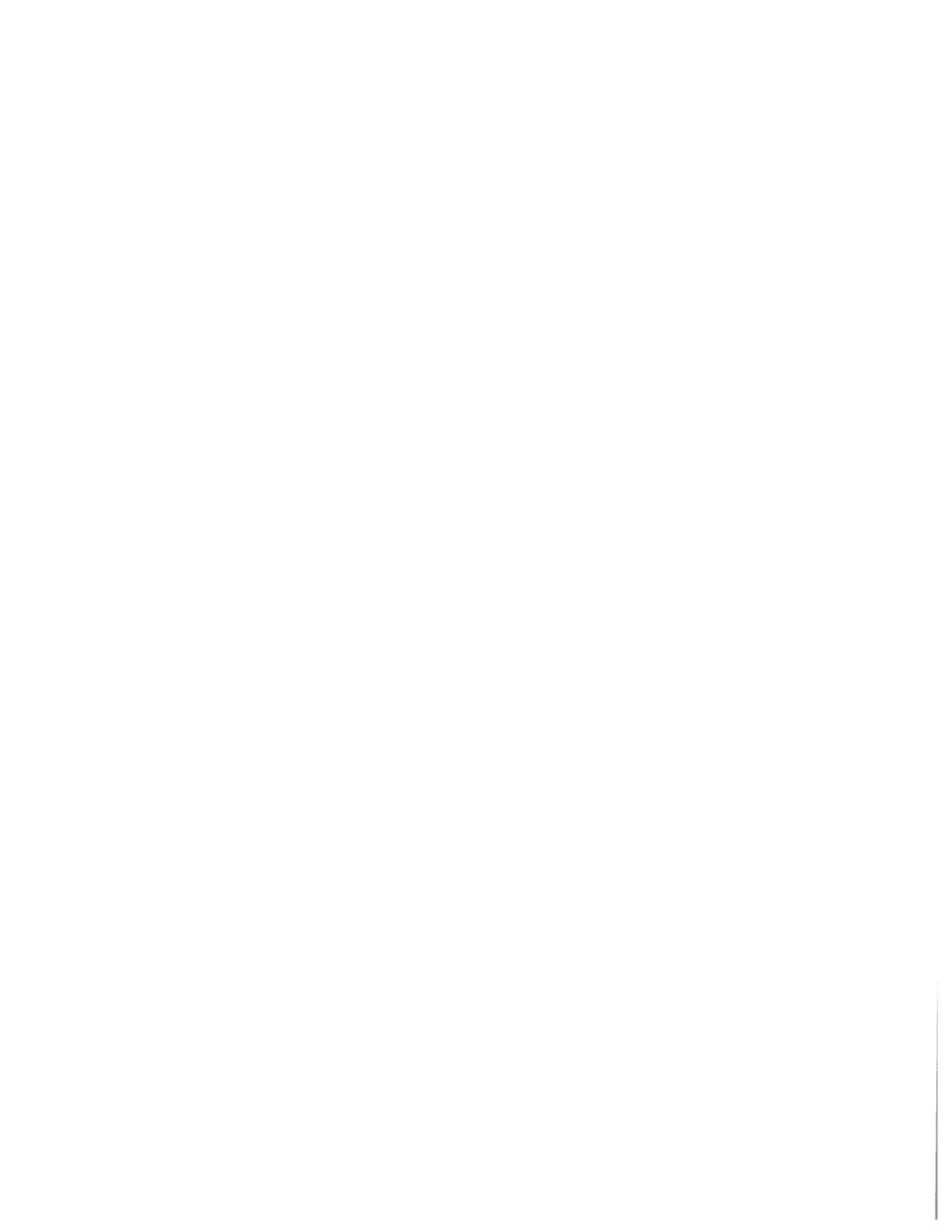
Ainsi, au sein même de l'espèce murine, il existe une grande variété de profils d'expression dans les ensembles de récepteurs Ly49 exprimés et une très grande diversité génétique selon les souches de souris. La très rapide évolution de cette famille de gènes y joue probablement un très grand rôle.

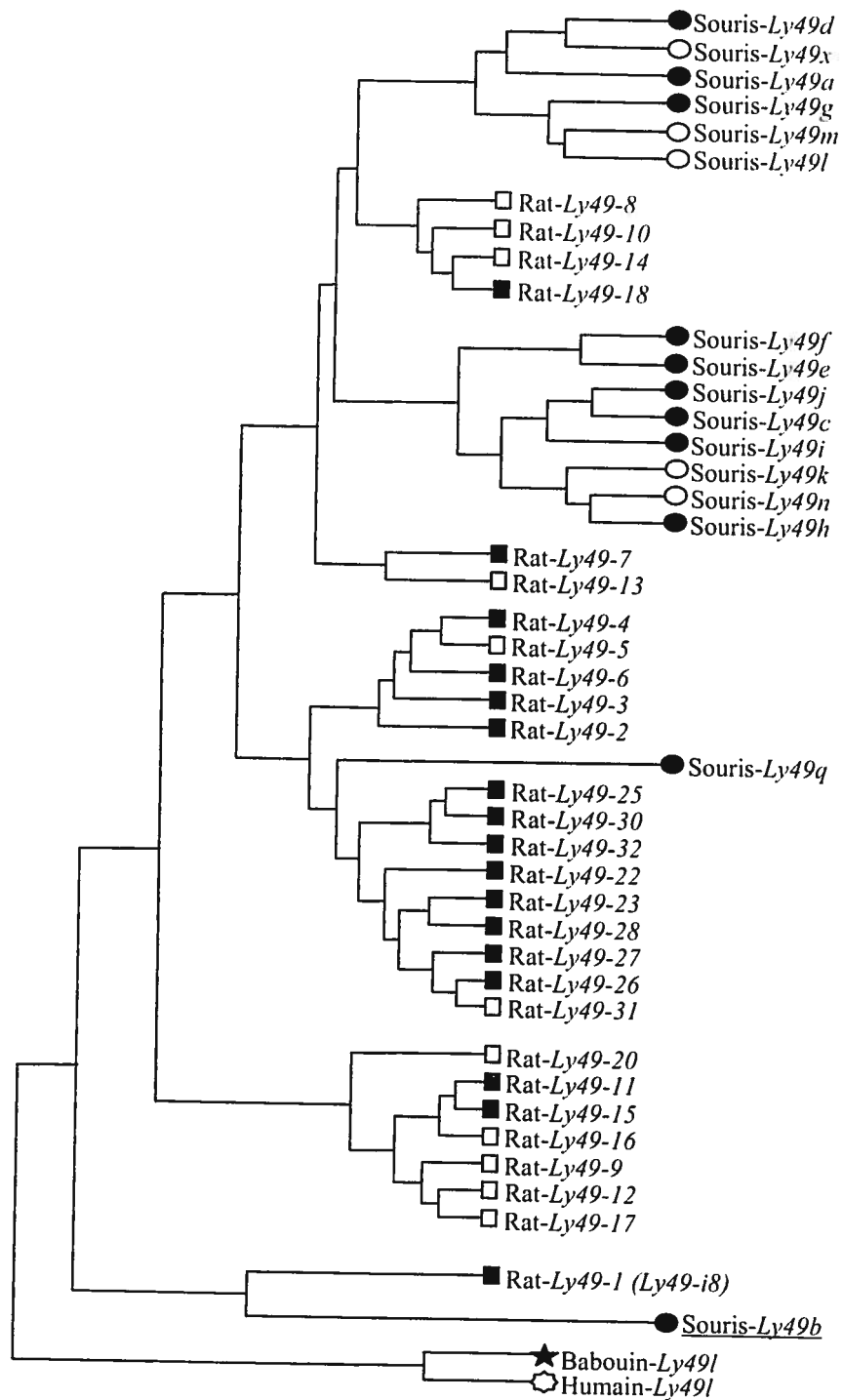
2.2 - Évolution de la famille des gènes *Ly49*

La souris, tout comme le rat, possède un (peut-être deux) gène *Kir* dans son génome (Hoelsbrekken *et al.*, 2003). Mais c'est principalement la famille des récepteurs *Ly49* qui assure la régulation fonctionnelle des cellules NK chez ces deux espèces. À l'exclusion des rongeurs, la seule autre espèce connue qui exprime plusieurs gènes *Ly49* est le cheval qui, par ailleurs, ne semble pas avoir de gènes KIR fonctionnels (Takahashi *et al.*, 2004). L'homme, les grands primates, le chien, le chat, les bovins, et le porc possèdent très peu de gènes *Ly49* et ce sont les récepteurs de la famille KIR qui assurent, chez ces espèces, la tolérance au soi via la reconnaissance des CMH de classe I (Gagnier, Wilhelm et Mager 2003; Sambrook *et al.*, 2006; Dobromylskyj et Ellis 2007).

Lorsque l'on étudie l'arbre phylogénique du rat et de la souris chez qui des gènes ou des pseudogènes codant pour des récepteurs *Ly49* ont été rapportés, on constate que le gène *Ly49b*, comme son équivalent chez le rat, a très peu évolué. Il est, de tous les gènes *Ly49* du rat et de la souris, celui qui serait le plus proche du *Ly49* ancestral (Wilhelm et Mager 2004). C'est le seul gène *Ly49* pour lequel un gène du rat est considéré comme l'orthologue du gène murin (Wilhelm et Mager 2004; Nylenna *et al.*, 2005).

Le dendrogramme élaboré par Hao et Nei démontre très clairement la forte homologie qui existe entre le gène *Ly49b* de la souris et le gène *Ly49-1* (préalablement nommé *Ly49-i8*) du rat (Hao et Nei 2004). Ceci semble indiquer que le gène *Ly49b* murin et le gène *Ly49-i8* du rat proviennent d'un gène ancestral commun aux deux espèces. Alors que la plupart des autres gènes *Ly49* sont apparus après la séparation des deux espèces, il y a de cela approximativement 33 millions d'années, le gène ancestral commun, le gène *Ly49b/i8* était déjà présent chez l'ancêtre de ces deux rongeurs (Nylenna *et al.*, 2005). Le dendrogramme présenté à la figure 2 illustre les affiliations génétiques qui existent entre les gènes *Ly49* de différentes espèces animales.





Hao et Nei ont effectué une comparaison des vitesses de mutation des gènes *Ly49* de la souris et du rat ainsi que des groupes de gènes *KIR*, *CMH-I*, *CMH-II* et des gènes *morphéus* chez l'homme, ces derniers étant à date les gènes ayant la plus grande vitesse de mutation connue (Johnson *et al.*, 2001). Ils ont établi que les vitesses de mutations des gènes *KIR* de l'homme et *Ly49* du rat sont moitié moins rapides (environ 50%) que les vitesses de mutations des gènes *morphéus*. Les vitesses de mutation des gènes *Ly49* murins sont quant à elles quatre fois moins rapides (28%) toujours par rapport aux gènes *morphéus*. Cependant les vitesses de mutation des gènes du *CMH (classe I et II)* humains ne sont que de 8%. Ces observations signifient que les gènes *KIR* et *Ly49* sont des gènes très diversifiés, en constante recombinaison et qu'ils mutent plus rapidement que les gènes codant pour leurs ligands (Hao et Nei 2004).

En se basant sur les homologies de séquences des différents gènes *Ly49* identifiés chez la souris B6, Wilhelm et collaborateurs avaient établi en 2002 un modèle d'évolution des gènes *Ly49* murins (Wilhelm, Gagnier et Mager 2002). Il est intéressant de noter que selon ce modèle, le gène *Ly49q* se distingue très tôt du groupe et reste par la suite inchangé. On constate donc que malgré une très forte plasticité dans cette région génomique, les gènes *Ly49b* et *Ly49q* n'ont pas divergé et n'ont pas engendré de nouvelles recombinaisons contrairement à la majorité des autres gènes *Ly49* (Wilhelm, Gagnier et Mager 2002). Les raisons de cette singularité ne sont pas encore connues, mais on peut supposer que la conservation de ces deux gènes est probablement en lien avec une fonction importante qui reste à identifier.

La même équipe a rapporté l'absence d'une séquence $(TAA)_n$ très ancienne dans les promoteurs des gènes *Ly49b* et *Ly49q*, alors que cette dernière est présente dans les promoteurs de tous les autres membres de la famille *Ly49* (Wilhelm, Gagnier et Mager 2002). L'absence de cette séquence en amont de l'exon 1 pourrait jouer un rôle crucial dans l'expression de ces gènes. Ceci a peut-être à voir avec le fait que, de tous les membres de la famille *Ly49*, seuls les produits de ces deux gènes ont été observés dans des cellules de la lignée myéloïde (Perrée 2003; Toyama-Sorimachi *et al.*, 2004; Toyama-

Sorimachi *et al*, 2005). Ces observations nous indiquent donc qu'à un moment précoce dans l'évolution des mammifères, un ancêtre commun à tous (primates, bovins, équins, canins, félins, porcins et rongeurs) devait posséder à la fois un gène ancestral *KIR* et un gène ancestral *Ly49* (Gagnier, Wilhelm et Mager 2003). L'évolution et les pressions sélectives ont favorisé selon les espèces la diversification de l'un ou l'autre de ces types de gènes: la famille *KIR* pour les primates, la famille *Ly49* pour les rongeurs et le cheval. Plus rarement, les deux types ont été conservés comme dans le cas des bovins (Birch et Ellis 2007). Des traces de cet embranchement se retrouve dans le génome des mammifères. En effet, à l'exception du chimpanzé et de l'humain, chez qui le gène *Ly49l* est un pseudogène, les primates possèdent un gène *Ly49l* fonctionnel et les souris et les rats possèdent un ou deux gène(s) *KIR* (Mager *et al.*, 2001; Guethlein *et al.*, 2002; Hoelsbrekken *et al*, 2003). Au sein même de la classe des rongeurs, le maintien à travers l'évolution de la séquence du récepteur ancestral *Ly49B/i8* suggère que sa fonction est importante, voire même vitale, à la survie de l'individu.

2.3 - Classification des récepteurs *Ly49* murins

La comparaison des séquences nucléotidiques et des structures prédites en acides aminés révèle une très forte homologie allant de 77 à 97% au niveau de la séquence nucléotidique entre les différents membres de la famille des récepteurs *Ly49*. La seule exception est le récepteur *Ly49B* qui ne présente qu'environ 70% d'homologie au niveau nucléotidique et environ 50% au niveau protéique avec les autres récepteurs *Ly49* (Wong *et al*, 1991; Brennan *et al.*, 1994; Smith, Karlhofer et Yokoyama 1994; Makrigiannis et Anderson 2000). Les récepteurs *Ly49* murins se distribuent en trois grandes catégories: les récepteurs apparentés à *Ly49A* (*Ly49A*, *D*, *G*, *L*, *M*, *O*, *P*, *R*, *T*, *V* et *W*), les récepteurs apparentés à *Ly49C* (*Ly49 C*, *H*, *I*, *J*, et *U*) et les autres, *Ly49B*, *E*, *F*, *Q* et *S* qui présentent une trop forte hétérogénéité pour faire partie de l'un ou de l'autre groupe (Kane, Silver et Hazes 2001).

Il est également possible de partager la famille des récepteurs *Ly49* en deux groupes en se basant plutôt sur les fonctions (potentielles ou établies) qui seraient induites lors de l'engagement des récepteurs avec leurs ligands. Cette répartition est basée d'une

part sur la présence (récepteurs inhibiteurs) ou l'absence (récepteurs activateurs) d'un domaine ITIM dans la portion cytoplasmique des récepteurs Ly49 et d'autre part, sur la présence d'un acide aminé chargé positivement dans le domaine transmembranaire des récepteurs dont la portion cytoplasmique n'a pas d'ITIM. À l'instar de ce que nous avons décrit précédemment pour les récepteurs CD94/NKG2 et KIR activateurs, ce résidu permet l'association du récepteur Ly49 à la protéine adaptatrice DAP12 dont la phosphorylation assurera la transduction du signal activateur lors de l'engagement du récepteur avec un ligand. (Smith *et al*, 1998). Ainsi, sur la base des séquences prédites en acides aminés, les récepteurs Ly49A, B, C, E, F, G, I, J, O, Q, S, T et V seraient potentiellement inhibiteurs et les récepteurs Ly49D, H, K, L, M, N, P, R, U, W, X et Y seraient potentiellement activateurs (Anderson, Ortaldo et McVicar 2001; Proteau, Rousselle et Makrigiannis 2004; Anderson *et al*, 2005). Il faut cependant garder en tête que les produits de certains de ces gènes ne sont pas exprimés chez certaines souches de souris en raison de la présence de codons stop dans la séquence codante ou de mutations modifiant le cadre de lecture (Kane, Silver et Hazes 2001; Makrigiannis *et al*, 2002; Proteau, Rousselle et Makrigiannis 2004). Tel que mentionné auparavant, certains de ces récepteurs pourraient être en réalité les produits d'allèles d'un même gène (p.13 à la section 2.1). Ce serait vraisemblablement le cas pour les récepteurs Ly49D et Ly49R, Ly49F et Ly49S de même que Ly49H et Ly49U (Makrigiannis *et al*, 2002; Wilhelm, Gagnier et Mager 2002). D'autres récepteurs pourraient avoir comme origine des recombinaisons d'exons (Makrigiannis *et al.*, 2001). En bref, la diversité des récepteurs de la famille Ly49 dépend à la fois de la multiplicité des gènes, elle-même générée par leur duplication, leur conversion ou leur recombinaison non-homologue ou encore par la délétion d'exons de la région codante, et des polymorphismes décelés à certains loci (Kane, Silver et Hazes 2001; Wilhelm, Gagnier et Mager 2002; Proteau, Rousselle et Makrigiannis 2004).

2.4 - Les ligands des récepteurs Ly49 murins

2.4.1 - Les CMH de classe I

La majorité des récepteurs Ly49 dont on connaît les ligands se lient à des molécules de classe I du CMH. Cependant leur affinité pour leurs ligands varie selon les récepteurs. Certains récepteurs Ly49 ont plusieurs ligands alors que d'autres n'ont qu'un seul ligand connu. Par exemple le récepteur Ly49A mis dans un contexte de reconnaissance de tétramères de CMH-I, est capable de fixer H-2D^d, D^k et faiblement D^b alors que le récepteur Ly49C reconnaît les CMH de classe I de type K^b, D^b, K^d, D^d et D^k (Hanke *et al.*, 1999). À l'opposé, le récepteur Ly49G2 se lie uniquement à la molécule H-2D^d. Il est important de noter que plusieurs récepteurs Ly49 n'ont pas encore de ligands connus, c'est notamment le cas du récepteur Ly49B. Enfin, certains récepteurs Ly49 se lient à des molécules autres que les CMH de classe I ou encore à des complexes CMH-I et peptides viraux. C'est le cas notamment du récepteur activateur Ly49P qui reconnaît spécifiquement les CMH de classe I de type H2^k uniquement lorsque les cellules cibles sont infectés par le virus MCMV (Desrosiers *et al.*, 2005). Les récepteurs Ly49H^{B6} et Ly49I^{I29}, quant à eux, reconnaissent tous les deux la protéine m157 du cytomegalovirus murin (MCMV) (Arase *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002).

En plus de se lier aux molécules du CMH de classe I exprimées sur les cellules avec lesquelles les cellules NK entrent en contact (liaison en *trans*), certains récepteurs Ly49 peuvent aussi se lier aux molécules CMH de classe I des cellules NK sur lesquelles ils sont exprimés (liaison en *cis*) (Doucey *et al.*, 2004; Scarpellino *et al.*, 2007). Cette capacité d'auto-reconnaissance pourrait avoir un rôle à jouer dans la régulation de l'activité des cellules NK ainsi que dans la régulation de l'expression des récepteurs Ly49.

2.4.2 - Un récepteur particulier : le Ly49H

En 1999, deux équipes ont localisé le locus *cmv1* dans la région située entre les gènes *ly49b* et *prp* sur le chromosome 6 de la souris (Brown *et al.*, 1999; DePatie *et al.*, 1999). Ce locus est responsable de la résistance des souris B6 à la réplication du virus MCMV dans la rate. Lee et collaborateurs ont démontré subséquemment que la susceptibilité d'autres souches de souris au MCMV était due à la délétion du gène *Ly49h* (Lee *et al.*, 2001). La même année, l'équipe de Dokun a rapporté que l'infection de souris B6 par le MCMV entraînait une prolifération spécifique des cellules NK Ly49H⁺ (Dokun *et al.*, 2001) et que celle-ci pouvait être inhibée lorsque les cellules NK étaient mises en présence d'un anticorps dirigé contre le récepteur Ly49H. En revanche, une telle prolifération n'était pas détectée lors d'une infection avec le virus de la vaccine. Au moment de la publication de ces articles, la protéine m157 du MCMV n'avait pas encore été identifiée comme ligand potentiel du récepteur Ly49H. Avec les connaissances actuelles, les observations de l'équipe de Dokun laissent supposer que c'est l'engagement du récepteur Ly49H avec son ligand qui induit la prolifération des cellules NK qui expriment ce récepteur. Le récepteur Ly49H pourrait donc servir de récepteur d'amplification de la réponse immunitaire et ainsi favoriser la lutte antivirale. La construction d'un virus MCMV mutant ayant une délétion de la protéine m157 a permis de démontrer qu'en absence d'une activation spécifique des cellules NK Ly49H⁺, les souris de souches résistantes au MCMV devenaient sensibles à ce virus (Bubic *et al.*, 2004). Plus récemment encore, une équipe a réussi à protéger des souris sensibles au MCMV en leur injectant des cellules T CD8⁺ dans lesquelles avait été transfecté un ADNc codant pour une protéine chimérique composée du domaine extracellulaire du récepteur Ly49H et du domaine intracellulaire de la protéine CD3ζ (Iizuka *et al.*, 2007). Ces deux expériences témoignent du rôle essentiel du récepteur Ly49H dans la lutte contre le MCMV.

La protéine m157 possède une structure moléculaire proche des molécules du CMH de classe I. Le mimétisme viral fait partie des modes d'échappement des virus au système immunitaire et la protéine m157 sert au virus MCMV à masquer aux « yeux »

des leucocytes, la diminution des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules infectées. Cependant la protéine m157 ne peut se lier à la β 2-microglobuline et n'a donc pas la capacité de fixer des fragments peptidiques et ainsi est incapable d'agir comme molécule présentatrice d'antigène (Adams *et al.*, 2007). La capacité du récepteur activateur Ly49H à reconnaître la protéine m157 est un atout pour les souris de la souche B6 qui expriment ce récepteur. Les souris des souches BALB/c ou 129 n'expriment pas le récepteur Ly49H et elles sont sensibles à ce virus. De plus, les souris 129/J expriment entre autres le récepteur inhibiteur Ly49I qui, outre de se lier à des CMH de classe I, reconnaît lui aussi, la protéine virale m157. Dans ce cas, il s'agit d'un avantage sélectif pour le virus puisque l'inhibition des cellules NK accroît la susceptibilité de ces souris au MCMV (Arase *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2007). Les souris de la souche B6 expriment elles aussi un récepteur Ly49I, mais celui-ci serait vraisemblablement le produit d'un allèle différent du gène *Ly49i* puisqu'il ne se lie pas à m157. À l'heure actuelle, il est difficile de déterminer si ces variations d'expression et de réactivité de récepteurs Ly49 avec la protéine m157 sont le fruit d'une adaptation du virus à l'hôte ou de l'hôte au virus. Les souches de souris consanguines analysées à ce propos ne sont pas suffisamment représentatives de la population murine pour pouvoir tirer des conclusions. Il faudrait pouvoir étudier les phénotypes de nombreuses souris sauvages pour tenter de répondre à cette question.

2.5 - Acquisition et expression des récepteurs Ly49 au cours du développement des cellules NK

Peu de choses sont connues quant à l'acquisition des récepteurs Ly49 sur les cellules autres que les cellules NK. Selon le type cellulaire concerné, cette acquisition s'y effectuerait vraisemblablement à des niveaux différents de maturation (Hart *et al.*, 2005; Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005; Toyama-Sorimachi *et al.*, 2005). La situation est cependant mieux connue pour les cellules NK. Celles-ci sont des cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme si elles ne sont pas régulées avec une fine précision. Les observations publiées au cours des dix dernières années nous permettent d'avoir aujourd'hui une assez bonne compréhension des mécanismes d'acquisition et de régulation des récepteurs Ly49 sur les cellules NK.

L'utilisation de la méthode de RT-PCR sur cellules individuelles a permis à Kubota et à ses collaborateurs de démontrer que le répertoire de récepteurs de chaque cellule NK prise individuellement est très diversifié. Dans une analyse portant sur 80 cellules NK individuelles issues de souris B6 (H-2^b), ces chercheurs ont identifié 66 profils d'expression lorsque dix récepteurs Ly49 et et trois récepteurs CD94/NKG2 étaient considérés. Cependant, 75% des cellules exprimaient au moins un des récepteurs Ly49C, Ly49I ou CD94/NKG2A, tous des récepteurs inhibiteurs qui reconnaissent au moins un ligand dans le fond H-2^b. La diversité des profils d'expression des différents récepteurs Ly49 observée sur les cellules NK a amené les auteurs à formuler l'hypothèse que les cellules NK exprimeraient de manière aléatoire des récepteurs Ly49 ou CD94/NKG2 jusqu'à exprimer un récepteur inhibiteur capable de reconnaître un CMH du soi. Comme pour les lymphocytes T, la sélection des cellules NK se ferait donc sur la base de leur réactivité face au soi (Kubota *et al.*, 1999).

Une autre équipe a plutôt proposé l'hypothèse de l'acquisition séquentielle des récepteurs Ly49. En observant l'évolution de l'acquisition des récepteurs Ly49 sur des cellules NK en voie de différenciation, l'équipe de Raulet a noté que les cellules NK exprimaient les récepteurs Ly49 dans un ordre successif et cumulatif précis (Dorfman et Raulet 1998; Raulet, Vance et McMahon 2001).

À l'aide de cellules NK transfectées avec des gènes codant pour des récepteurs Ly49 spécifiques, Fahlèn et ses collaborateurs ont rapporté en 2001 que l'expression d'un premier récepteur Ly49 capable de reconnaître des molécules du CMH de classe I du soi réduisait le pourcentage de cellules NK qui exprimaient des récepteurs Ly49 endogènes (récepteurs Ly49 transcrit à partir des gènes compris dans les chromosomes et non pas dans les plasmides transfectés) (Fahlen, Lendahl et Sentman 2001). Ainsi les cellules NK exprimeraient des récepteurs Ly49 de manière aléatoire et l'expression d'un premier récepteur inhibiteur spécifique au soi influencerait l'expression des autres récepteurs Ly49. Un problème se pose alors : si l'expression des récepteurs Ly49 se fait de manière successive jusqu'à obtenir des récepteurs avec suffisamment d'affinité pour les ligands du soi, comment se fait-il qu'une telle diversité de profils d'expression soit observée chez un même individu?

Deux théories récentes permettent de fournir des réponses à cette question, et ces deux modèles sont basés sur une sélection des cellules NK lors de leur maturation. La première suggère que les cellules NK qui ne possèdent pas suffisamment de récepteurs inhibiteurs capables de reconnaître les CMH de classe I du soi deviennent hyporépondantes par un mécanisme impliquant leurs récepteurs activateurs (Fernandez *et al.*, 2005). La seconde théorie part du principe qu'il n'existe pas un mais deux types de cellules NK dans l'organisme : les cellules NK ayant reçu l'autorisation d'effectuer la surveillance du soi, et des cellules qui n'ont pas été autorisées (Kim *et al.*, 2005). Ce modèle, connu sous le terme de « Licensing » ou accréditation, sera abordé dans le prochain chapitre.

2.6 - Modulation des propriétés fonctionnelles des cellules NK

Les cellules NK ont la possibilité de tuer des cellules anormales (tumorales ou infectées) sans stimulation préalable par un antigène en détectant simplement sur les cellules cibles une diminution du niveau d'expression des molécules de classe I du CMH (classiques et non-classiques). Pour expliquer comment les cellules NK font la distinction entre les cellules saines et les cellules anormales, l'équipe de Kärre a élaboré dans le début des années 1990 l'hypothèse du « missing-self » (Ljunggren et Karre 1990). Celle-ci stipulait que les cellules NK détruisaient les cellules qui n'exprimaient pas la bonne quantité ou le bon type de CMH de classe I. Ainsi les cellules NK d'une souris de phénotype H-2^d pouvaient lyser des cellules de phénotype H-2^k *in vitro* (Karre 1991). Cependant, plusieurs observations ont mis en évidence que ce ne pouvait être aussi simple que cela. En premier lieu, les cellules NK d'une souris hybride de type (AxB)F₁ pouvaient lyser des cellules du parent A ou B (Cudkowicz et Stimpfling 1964; Bennett 1987). De plus, les cellules NK issues de souris déficientes en CMH-I, n'étaient pas aptes à rejeter des greffes de moelle osseuse de souris saines qui seraient rejetées par des cellules NK normales. (Ohlen *et al.*, 1989; Bennett *et al.*, 1995). Ces observations impliquent qu'il existe un système de sélection des cellules NK qui permet que l'activité cytotoxique de celles-ci soit contrôlée en fonction du niveau d'expression des CMH de

classe I de l'hôte. Si la reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK se fait bien par évaluation de l'expression des CMH de classe I, celle-ci nécessite une accréditation préalable des cellules NK qui se ferait en fonction de l'expression des CMH-I des cellules environnantes. L'acquisition de la capacité à éliminer certaines cellules du soi devenues anormales passerait donc par le processus de reconnaissance et d'autorisation appelé « Licensing » ou accréditation (Kim *et al.*, 2005).

Bien que l'acquisition des récepteurs Ly49 à la surface des cellules NK semble s'effectuer de manière aléatoire, la présence d'un récepteur Ly49 inhibiteur spécifique au soi serait nécessaire pour que les cellules NK soient accréditées (Kim *et al.*, 2005). Il semble également que la force de l'interaction entre les récepteurs Ly49 et leurs ligands ainsi que les fréquences d'expression de ces récepteurs aient un rôle à jouer dans la tolérance au soi des cellules NK (Johansson *et al.*, 2005). La modulation de l'expression des récepteurs Ly49 à la surface des cellules NK a donc ici une influence sur l'activité fonctionnelle de ces cellules. Ainsi, les cellules NK exprimant des récepteurs Ly49 inhibiteurs pour un CMH-I du soi peuvent obtenir l'autorisation de participer à la surveillance et d'éliminer les cellules aberrantes car elles possèdent un moyen de quantifier l'expression des CMH-I des cellules cibles. Les cellules NK non accréditées auraient leurs fonctions cytotoxiques naturelles inhibées, mais ne seraient pas inutiles à l'organisme pour autant car elles pourraient tout de même être activées dans un contexte d'infection (Yokoyama et Kim 2006a, b).

Plusieurs facteurs peuvent engendrer une modulation du niveau d'expression des récepteurs Ly49 à la surface des cellules NK. Une analyse détaillée de cette question ayant déjà été réalisée par un autre étudiant de notre laboratoire (Perrée 2003), nous n'aborderons ici que les principaux faits.

Le profil d'expression des récepteurs Ly49 varie d'abord en fonction de l'âge. Il semble notamment que ce sont les récepteurs Ly49E et CD94/NKG2 qui sont responsables de l'activité de surveillance des cellules NK au stade fœtal (Takei *et al.*, 2001; Stevenaert *et al.*, 2003). Le niveau d'expression du récepteur Ly49E diminue ensuite dès la naissance au fur et à mesure que les cellules NK de l'hôte acquièrent progressivement d'autres récepteurs Ly49 (Ly49A, C, D, I, G2, et autres) (Dorfman et

Raulet 1998; Ortaldo, Winkler-Pickett et Wiegand 2000). Au cours de la gestation, on observe une augmentation du niveau d'expression des récepteurs Ly49 inhibiteurs sur les cellules NK de la paroi utérine ce qui a pour effet de favoriser la tolérance mère-fœtus (Croy *et al.*, 2003; Zhang, Croy et Tian 2005).

L'interaction des récepteurs Ly49 avec leurs ligands entraîne également une modulation de l'expression de ces récepteurs. Outre le phénomène d'acquisition sélective mentionné dans la section 2.5 de la revue bibliographique, l'affinité d'un récepteur Ly49 pour un CMH-I du soi influence le niveau d'expression de ce récepteur (Gosselin *et al.*, 1997). Il semblerait d'ailleurs que la calibration du niveau d'expression des récepteurs Ly49 soit régulée à la fois par la reconnaissance des ligands spécifiques en *trans* et en *cis* (Scarpellino *et al.*, 2007).

L'épissage alternatif pourrait également être un moyen de réguler le niveau d'expression des récepteurs Ly49. On sait notamment que les ARNm codant pour les récepteurs Ly49D, G, H, I, J et W peuvent être soumis à l'épissage alternatif. La majorité des modifications de structure résultant de ces épissages sont localisées dans les exons 6 et 7 qui correspondent au CRD (Silver *et al.*, 2001), mais il semblerait que les ARNm codant pour certains gènes *Ly49* puissent subir un épissage de l'exon 3 qui code pour le domaine transmembranaire de ces récepteurs. C'est notamment le cas des gènes *Ly49g*, *Ly49h* et *Ly49j*. Dans une étude portant sur le gène *Ly49j*, plus de 80% des ARNm isolés présentaient une délétion de l'exon 3. Bien qu'aucun récepteur Ly49J-tronqué n'ait été détecté à ce jour, il est possible que cet ARNm code pour une protéine cytoplasmique fonctionnelle dont le domaine ITIM pourrait entrer en compétition lors du recrutement de la protéine SHP-1 avec d'autres récepteurs inhibiteurs et ainsi diminuer l'intensité du signal (McQueen *et al.*, 1999; Silver *et al.*, 2001).

Plusieurs cytokines sont également capables d'induire une modulation du niveau d'expression de certains récepteurs Ly49 sur les cellules NK mais, étant donné que le présent mémoire implique de telles modulations, nous reviendrons sur cette question dans la discussion.

2.7 - Expression et fonctions des récepteurs Ly49 sur des populations cellulaires autres que les cellules NK

La modulation de l'expression des récepteurs Ly49 sur les cellules NK murines est difficile à interpréter car il n'y a pas de lignée cellulaire sur laquelle mesurer l'effet d'éventuels agents modulateurs. Cependant, il a été démontré que les récepteurs Ly49 pouvaient être modulés sur d'autres populations cellulaires et que la variation de densité de ces récepteurs pouvait influencer l'intensité du signal transmis. Ainsi en 2003, grâce à la création de lymphocytes T humains transfectés qui exprimaient des niveaux variables de récepteurs Ly49, notre laboratoire a publié une étude qui démontre ce fait (Chalifour *et al.*, 2003). Par exemple, la force de l'inhibition induite lors de l'interaction Ly49A/H-2D^d dépend de la densité des récepteurs Ly49A à la surface des cellules. Il existe cependant un niveau d'expression au delà duquel l'intensité du signal d'inhibition n'est plus augmentée. Une modulation du niveau d'expression des récepteurs Ly49A à la surface des cellules NK peut donc faire varier la réponse cellulaire face à une activation spécifique en modifiant l'intensité de l'inhibition induite par l'engagement de ces récepteurs.

Outre de participer à la régulation de l'activité cytotoxique et de la production de cytokines par les cellules NK, les récepteurs Ly49 exercent sans doute d'autres fonctions sur celles-ci comme sur d'autres populations de leucocytes. Par exemple, en utilisant une lignée de cellules NK de rat transfectée avec les ADNc de Ly49A ou Ly49D, des auteurs ont démontré que l'engagement de ces récepteurs avec des anticorps agonistes ou un CMH de classe I modifiait la réponse chimiotactique des cellules NK à des ligands de certaines chimiokines du groupe CXC (Inngjerdigen, Rolstad et Ryan 2003). La détection de récepteurs Ly49 essentiellement inhibiteurs à la surface de lymphocytes T, surtout des cellules CD8⁺ ayant un phénotype de cellules mémoires, et de cellules NKT, a permis de mettre en évidence leur capacité à inhiber l'activation de ces cellules suite à l'engagement du TCR avec son ligand par un anticorps agoniste ou dans d'autres contextes (Kane, Lavender et Ma 2004). Il est intéressant de souligner la présence du récepteur inhibiteur Ly49F sur une portion importante des cellules T CD8⁺ alors que c'est

le récepteur le moins commun sur les cellules NK (Coles *et al*, 2000). Peut-être y a-t-il une certaine spécialisation dans la fonction exercée par certains récepteurs Ly49. C'est ce que pourrait suggérer la présence de Ly49E et l'exclusion des autres récepteurs de cette famille sur les cellules NK fœtales, un fait que nous avons déjà souligné (Van Beneden *et al*, 2001). L'engagement des récepteurs Ly49 inhibiteurs exprimés sur les cellules NKT semble notamment moduler l'activité de ces cellules lors du contact avec des cellules dendritiques (Maeda *et al.*, 2001). Ces récepteurs pourraient aussi jouer un rôle dans la régulation de la prolifération des cellules NKT (Skold et Cardell 2000).

Une autre étude a par ailleurs rapporté qu'en présence d'IFN- γ , l'expression du récepteur Ly49Q était augmentée à la surface des macrophages péritonéaux préalablement stimulés par l'inoculation de thioglycollate et que l'engagement de ce récepteur avec un anticorps agoniste entraînait des modifications de leur cytosquelette. Par ailleurs, l'incubation de cellules de la lignée RAW 264.7 qui expriment aussi Ly49Q avec l'anticorps agoniste n'a induit aucun changement dans la production d'IL-12 ou d'oxyde nitrique (NO) pas plus que dans les propriétés phagocytaires de ces cellules. Ces observations suggèrent que le récepteur Ly49Q pourrait avoir un rôle à jouer dans la régulation des mouvements des macrophages en contexte inflammatoire, une fonction qui nécessiterait que le niveau d'expression du récepteur soit d'abord augmenté par l'IFN- γ (Toyama-Sorimachi *et al*, 2004).

Le récepteur inhibiteur Ly49Q est le premier récepteur Ly49 dont la présence sur des cellules myéloïdes a officiellement été rapportée dans la littérature (Toyama-Sorimachi *et al*, 2004). Cependant, un étudiant de notre laboratoire avait préalablement observé la présence du récepteur Ly49B sur ce type de cellules (Perrée 2003). Puisque la poursuite de la caractérisation de ce récepteur fait l'objet de ce mémoire, nous allons résumer dans une section séparée l'ensemble des faits connus à son propos. Cependant, toutes les expériences exposées dans ce document ayant été faites avec une lignée de macrophages, nous rappellerons d'abord les principales caractéristiques et propriétés de ces cellules.

3 - Les macrophages

Bien que les macrophages aient été découverts dans les années 1880, par Ilya Ilyich Mechnikov, leur caractérisation (origine et fonctions) a surtout progressé à partir du moment où l'anticorps F4/80, spécifique aux macrophages murins, a été produit (Austyn et Gordon 1981). On sait aujourd'hui que les macrophages sont parmi les cellules hématopoïétiques les plus précoces à apparaître dans l'embryon où elles jouent un rôle majeur dans l'organogenèse et le remodelage des tissus.

Les macrophages dérivent d'un précurseur commun aux granulocytes et aux monocytes. Les premières étapes de leur développement ont lieu dans le foie fœtal et plus tard dans la moelle osseuse. Les monocytes du sang et la majorité des macrophages tissulaires dérivent d'un même précurseur, le promonocyte (revue par Gordon *et al.*, 1992). Des millions de promonocytes sont produits chaque jour dans la moelle osseuse. Les promonocytes se différencient en monocytes qui quittent la moelle osseuse pour entrer dans la circulation sanguine, et se répartir dans tout l'organisme. Selon les besoins de l'organisme, les monocytes vont sortir de la voie sanguine et pénétrer dans les tissus où ils vont se différencier en cellules dendritiques ou en macrophages tissulaires dont les fonctions sont parfois spécifiques à l'organe dans lequel ils sont implantés (Gordon et Taylor 2005).

Bien que les macrophages aient un rôle majeur à jouer dans le maintien de l'homéostasie des tissus par l'élimination des cellules sénescents et le remodelage des tissus abîmés lors de l'inflammation, leur principal rôle est d'assurer une surveillance de première ligne face à l'intrusion de microorganismes pathogènes dans l'organisme.

3.1 - Propriétés des macrophages

Les principales propriétés des macrophages circulants sont :

- **La phagocytose** : les macrophages ont la possibilité d'ingérer des micro-organismes ou des débris de grande taille et de les détruire selon un processus complexe qui implique de nombreux enzymes, récepteurs membranaires et protéines du cytosquelette. La phagocytose est une phase clé de la présentation antigénique requise pour l'induction d'une réponse immunitaire acquise. Un dérèglement de la capacité phagocytaire des macrophages peut être la source de nombreuses maladies auto-immunes (Djaldetti *et al.*, 2002).
- **La présentation d'antigène** : Les macrophages sont capables d'apprêter des fragments peptidiques provenant des particules ou micro-organismes phagocytés et de les présenter aux cellules du système immunitaire. Une fois ingérés, les cellules ou débris capturés sont dégradés dans les endosomes puis dans les lysosomes en fragments peptidiques. Les peptides, d'origine exogène (bactéries, virus, parasites, champignons) ou endogène (matrice, cellules apoptotiques ou tumorales) vont être présentés aux cellules concernées par l'intermédiaire des molécules du CMH de classe I ou II à la surface des macrophages. Les complexes CMH/peptide ainsi présentés vont pouvoir être reconnus par des lymphocytes T de manière spécifique à chaque antigène via leurs TCR (récepteurs des cellules T). La présentation antigénique va permettre l'activation de lymphocytes spécifiques et l'initiation de la réponse acquise (Plowden *et al.*, 2004).
- **La production de cytokines et de chimiokines**: Les macrophages activés sécrètent un grand nombre de cytokines et de chimiokines dont l'action peut se manifester en circuits autocrine ou paracrine. Outre d'amplifier ou de régulariser leur propre niveau d'activation, ces médiateurs contribuent au recrutement, à l'activation et à la régulation des autres effecteurs de l'immunité naturelle et

acquise. La nature des molécules produites par les macrophages dépend de la forme d'activation à laquelle ils répondent (Murtaugh et Foss 2002; Mantovani *et al.*, 2004). L'action de chacune des cytokines qui ont été utilisées dans les expérimentations rapportées dans ce mémoire sera développée ci-après.

- **La sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires** : Dans certaines conditions d'activation, les macrophages ont en outre la capacité d'engendrer une explosion respiratoire, également appelée flambée oxydative, qui se caractérise par la production de différentes formes réactives de l'oxygène, ou de synthétiser du monoxyde d'azote (NO), des prostaglandines, des leucotriènes, des facteurs du complément et bien d'autres. Plusieurs de ces médiateurs sont de puissants agents pro-inflammatoires ou microbicides et permettent de faciliter l'élimination des agents pathogènes (Iles et Forman 2002). Parmi toutes ces molécules, le NO présente un intérêt particulier. Sa production par les macrophages est induite dans plusieurs circonstances dont la fixation de l'IFN- γ , la reconnaissance de PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) par des TLRs (Toll-like receptor) ou par contact cellulaire via l'engagement de récepteurs spécifiques comme par exemple lors de la liaison CD40-CD154 (Mosser 2003). Selon sa concentration dans le milieu intercellulaire et le type de cellules avec lesquelles il est en contact, le NO peut soit induire le processus apoptotique, soit assurer le maintien de la viabilité cellulaire (Bosca *et al.*, 2005). Le NO joue également un rôle dans l'élimination de certains pathogènes en bloquant la réplication de l'ADN (comme c'est le cas lors d'une infection par le virus de la vaccine), en empêchant le processus d'acidification des phagosomes, étape nécessaire au développement de certaines bactéries comme *Mycobacteria tuberculosis* et *M. avium*, ou encore en favorisant l'apparition de mutation dans le génome du pathogène comme c'est le cas pour *Salmonella typhimurium* (revue par MacMicking, Xie et Nathan 1997). Puisqu'il s'agit d'un facteur clé dans l'activation du macrophage, la quantification du NO est fréquemment utilisée comme mesure de la réponse de ces cellules à différents agonistes et pour identifier parallèlement les facteurs et récepteurs qui jouent un rôle dans la régulation de sa production.

3.2 - La production de NO comme témoin de l'activation des macrophages

Le niveau d'expression du NO par les macrophages est augmenté lorsque ces derniers sont recrutés à un site inflammatoire ou lorsqu'ils reconnaissent des agents pathogènes. Il a été démontré avec plusieurs types de macrophages que l'augmentation de NO pouvait être induite suite à la réception d'un signal d'activation (IFN- γ ou LPS) suivie de l'engagement de CD40 avec son ligand ou avec un anticorps agoniste (Nashleanas et Scott 2000).

CD40 est une protéine transmembranaire de type I, monomérique de la famille des TNF-R (Tumor necrosis factor-Receptor). On avait d'abord cru que CD40 était exclusif à la lignée des lymphocytes B, mais on sait aujourd'hui que sa distribution est beaucoup plus vaste. Comme nous l'avons déjà mentionné à la section précédente, les monocytes/macrophages expriment CD40 dont le ligand, CD40L (CD40-Ligand ou CD154), est un membre de la famille du TNF exprimé principalement par les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules NK activées. Sur les macrophages, CD40 est impliqué dans la lutte anti-microbienne étant donné que sa liaison avec les protéines membranaires CD40L des lymphocytes T entraîne l'induction de la production de NO par les macrophages. Par ailleurs, le contact CD40-CD40L entre le macrophage et la cellule NK augmente le potentiel phagocytaire du macrophage et entraîne l'activation de la cellule NK (Scott et al., 2004). L'engagement de CD40 à la surface des macrophages entraîne également des changements phénotypiques qui se traduisent notamment par l'augmentation du niveau d'expression de molécules de co-stimulation, une production accrue de plusieurs cytokines et enzymes et une meilleure survie des cellules (van Kooten et Banchereau 2000).

L'utilisation de CD40 comme voie d'activation du macrophage est donc possible grâce à la disponibilité commerciale d'anticorps agonistes spécifiques à ce récepteur, et cette activation est quantifiable en mesurant la quantité de NO libérée dans le milieu. Ceci constitue donc un moyen simple d'estimer l'effet de l'engagement d'un récepteur activateur sur des macrophages.

3.3 - Les différentes voies d'activation des macrophages

Il est dans la nature humaine de vouloir catégoriser et schématiser les phénomènes observés afin de mieux les comprendre et le macrophage n'a pas échappé à cette tendance. Ses rôles pléiotropiques ont incité les auteurs à catégoriser les macrophages activés en deux grands groupes; M1 et M2, en se basant sur les types de réponses auxquelles ils contribuent (réponse de type Th1 ou de type Th2). Cependant, une fois stimulé, le macrophage ne présente pas juste un type de fonction mais plutôt un éventail de modifications fonctionnelles progressives et modulables, notamment selon la composition en cytokines de son microenvironnement. Ainsi, bien que le modèle de ségrégation puisse être utile, l'extrême simplification s'avère risquée lorsque l'on constate la grande diversité des types d'activation des macrophages (Mantovani *et al*, 2004; Stout et Suttles 2004; Mantovani, Sica et Locati 2005, 2007).

Il est communément admis qu'il existe quatre types d'activation des macrophages dont les principaux éléments peuvent être résumés comme suit (Gordon 2003; Mantovani *et al*, 2004) :

- L'activation dite naturelle, qui ne dépend pas de la reconnaissance spécifique d'un antigène par des lymphocytes T, est attribuable à la reconnaissance de motifs associés à des microorganismes pathogènes dont les structures ont été conservées durant l'évolution. Cette activation est possible grâce aux récepteurs de PAMPs, tels que les TLRs, les récepteurs TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells), le CD14 associé à la LBP (Lipopolysaccharide binding protein) et les récepteurs associés aux lectines de type C dont Dectine-1, Dectine-2 et LOX-1 (Pyz *et al*, 2006; Sato *et al.*, 2006). L'activation des macrophages par l'engagement de ces récepteurs entraîne, entre autres, la production de plusieurs métabolites aux propriétés anti-microbiennes dont le NO, diverses formes réactives de l'oxygène, et la synthèse de cytokines pro ou anti-inflammatoires, telles que les interférons de type I (α/β) ou le TNF- α (Iles et Forman 2002).

- L'activation dite humorale dépend de la présence à la surface des macrophages de récepteurs pour des facteurs du complément et de récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines. La présence de ces récepteurs permet aux macrophages d'assimiler par phagocytose des agents pathogènes opsonisés (virus, bactéries) ou leurs produits (toxines). Cette forme d'activation entraîne une augmentation de l'activité cytolitique du macrophage et la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires selon les besoins (Mosser 2003).
- L'activation classique concerne essentiellement les macrophages du type M1. Il s'agit de la plus efficace des formes d'activation du macrophage. Elle s'effectue en deux étapes, à savoir une préactivation par l'IFN- γ , suivie d'une seconde activation qui peut être induite par différents agonistes tel que le LPS ou le TNF- α . Cette activation engendre des modifications importantes de l'activité du macrophage notamment la mise en route de la flambée oxydative, la production de NO, la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α , IL-6), ainsi que l'augmentation de la présentation antigénique par les CMH de classe II. Les macrophages ainsi activés sont très dangereux, pour les agents pathogènes (car c'est précisément leur rôle que de les éliminer), mais aussi pour l'organisme puisqu'ils sont à l'origine de graves lésions tissulaires. Il existe cependant un mécanisme de désactivation très efficace qui implique l'IL-10 principalement, mais aussi les récepteurs Scavenger (SR-A), les glucocorticostéroïde et le TGF- β (Iles et Forman 2002; Duffield 2003).
- Il existe une quatrième forme d'activation du macrophage que l'on qualifie d'activation alternative. Cette activation nécessite la reconnaissance par le macrophage des cytokines IL-4 ou IL-13 et oriente son activité vers une réponse de type Th2. Le macrophage se spécialise alors dans la lutte antiparasitaire, la réponse allergique et l'immunité à médiation humorale. L'activation alternative se caractérise par une augmentation de la présentation antigénique par les CMH de classe II, une augmentation de la phagocytose et

l'expression accrue des récepteurs de mannose. Il est important de faire la distinction entre les rôles de l'IL-4 qui entraîne une activation alternative du macrophage, et de l'IL-10 qui entraîne une désactivation de l'activation classique du macrophage (Duffield 2003; Mosser 2003).

Ainsi les macrophages peuvent être activés par des éléments endogènes (cytokines, chimiokines, contact direct avec une cellule du système immunitaire, corps apoptotiques et autres) ou exogènes (LPS, glycolipides bactériens, ARN viraux, ADN bactériens, β -Glucan, flagelles bactériens et autres). Le macrophage peut répondre de différentes façons selon les stimuli responsables de son activation, et cela afin d'adapter ses fonctions aux besoins de l'organisme. Connaître les conditions qui entraînent la modulation de l'expression d'un récepteur à la surface des macrophages peut donc être une information clé pour déterminer le rôle de cette protéine sur cette population cellulaire.

3.3.1 - Activation via les Toll-Like Receptors

Les TLRs sont des récepteurs de PAMPs, des motifs protéiques, nucléiques ou lipidiques communément associés à des agents pathogènes. Ces motifs sont très conservés et souvent redondants chez de nombreux parasites, champignons, bactéries et virus. Les TLRs confèrent donc aux macrophages la capacité de reconnaître un danger dès qu'il se manifeste et d'initier rapidement une réponse immunitaire spécifique (O'Neill 2006).

Les principales fonctions des TLRs sont l'induction de l'inflammation et l'initiation du développement de l'immunité spécifique. Ainsi, l'activation induite par l'engagement des TLRs peut entraîner la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6 et le TNF- α . Ces cytokines permettent d'inciter les cellules environnantes à synthétiser des chimiokines ou des molécules d'adhésion afin de favoriser le recrutement des cellules du système immunitaire. Mais ce mécanisme puissant est une arme à double tranchant car une trop forte réponse inflammatoire peut être la cause d'un choc septique (Kaisho et Akira 2006).

D'un point de vue structural, les TLRs sont des protéines transmembranaires de type I caractérisées par une région extracellulaire très variable contenant des domaines répétés riches en leucine (LRR) et une région intracellulaire très conservée qui inclut un domaine homologue à la région cytoplasmique du récepteur de l'IL-1, le domaine TIR (Toll/IL-1 Receptor) (revue par Miggin et O'Neill 2006). Chez les mammifères, la famille des récepteurs TLRs est constituée d'au moins 13 membres. Les TLRs 1 à 9 ont une structure très conservée entre l'humain et la souris. Le TLR10 est présent chez l'humain mais tronqué chez la souris. Les souris expriment en revanche le TLR11 dont le gène présente plusieurs codons stop précoces chez l'homme (Takeda et Akira 2004, 2005; Miggin et O'Neill 2006; Parker, Prince et Sabroe 2007).

3.3.1.1 - TLR1, TLR2 et TLR6

Le TLR2 est impliqué dans la reconnaissance d'une grande variété de composants microbiens, dont des lipoprotéines et des lipopeptides issus de différents types de microorganismes, des peptidoglycans de bactéries à Gram positif, des glycolipides de certaines bactéries de la famille des *Treponema* (Schroder et al., 2000) et du zymosan de la levure *Saccharomyces Cerevisiae*. Le TLR2, reconnaît une vaste gamme de ligands dû au fait qu'il est capable de former des hétérodimères avec d'autres TLRs, les TLR1 et TLR6, tous les trois étant très homologues d'un point de vue structural. Le TLR2 est également capable de fonctionner en collaboration avec d'autres récepteurs tel que le CD36 (Hoebe *et al.*, 2005) ou d'autres récepteurs de PAMPs, par exemple le récepteur Dectine-1, un récepteur de type lectine qui fixe les composants des parois fongiques, comme le β -glucan. Le TLR2, ainsi que toutes les formes hétérodimériques qui lui sont liées, sont exprimés à la surface des macrophages (Jones *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006).

3.3.1.2 - TLR3

Le TLR3 est impliqué dans la reconnaissance de l'ARN double brin (ARNdb), produit par la majorité des virus durant leur réplication. L'engagement du TLR3 induit la synthèse d'IFN de type I (α/β). Le TLR3 est spécifiquement exprimé dans les endosomes. Il peut être engagé par une molécule synthétique, le poly(I:C) qui simplifie l'analyse des effets produits (Alexopoulou *et al.*, 2001).

3.3.1.3 - TLR4

Le TLR4 reconnaît principalement le lipopolysaccharide (LPS) de la paroi des bactéries à Gram négatif, mais il est également apte à reconnaître d'autres particules exogènes telles que le taxol produit par des plantes, certaines protéines virales, des molécules endogènes, telles que les protéines de stress HSP60 et HSP70, le fibrinogène, et des oligosaccharides de l'acide hyaluronique. Alors que de très faibles concentrations de LPS sont suffisantes pour engager le récepteur TLR4 à la surface des macrophages, les autres ligands (taxol, fibrinogène, etc...) requièrent de plus fortes concentrations (Dobrovolskaia et Vogel 2002). Certaines protéines ont la capacité de se combiner au TLR4 et d'ainsi moduler l'affinité et la reconnaissance des PAMPs auxquels il se lie. C'est notamment le cas des protéines MD-2 et CD14 (Fujihara *et al.*, 2003; Saitoh *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005). Outre de moduler l'affinité du TLR4, la protéine MD-2 régule également sa localisation membranaire (Nagai *et al.*, 2002), et la protéine CD14 influence la voie de signalisation activée suite à son engagement (Jiang *et al.*, 2005).

3.3.1.4 - TLR5

Le TLR5 est exprimé par de nombreuses cellules dont les macrophages et les cellules épithéliales intestinales. Le TLR5 reconnaît un constituant protéique monomérique issu de flagelles bactériens : la flagelline. Ce récepteur est donc un

atout majeur dans la lutte anti-bactérienne et le maintien de l'intégrité de la flore intestinale (Hayashi *et al.*, 2001).

3.3.1.5 - TLR7 et TLR8

Les TLR7 et TLR8 reconnaissent tous les deux des ARN simple brin (ARNsb) produits notamment lors d'infections virales. L'hôte exprime également de grandes quantités d'ARNsb, cependant les TLR7 et TLR8 étant compartimentés dans des endosomes, ils ne sont jamais en contact avec les ARNsb de l'hôte (Takeda et Akira 2005).

3.3.1.6 - TLR9

Le TLR9 reconnaît des séquences CpG non-méthylées d'ADN bactérien ou viral. Des oligonucléotides de synthèse non-méthylés peuvent être utilisés pour activer les macrophages via ce récepteur. À l'instar des TLR3, 7 et 8 qui reconnaissent aussi des acides nucléiques, le TLR9 est exprimé dans les endosomes (Krieg 2000; Dalpke *et al.*, 2006).

3.3.1.7 - TLR11

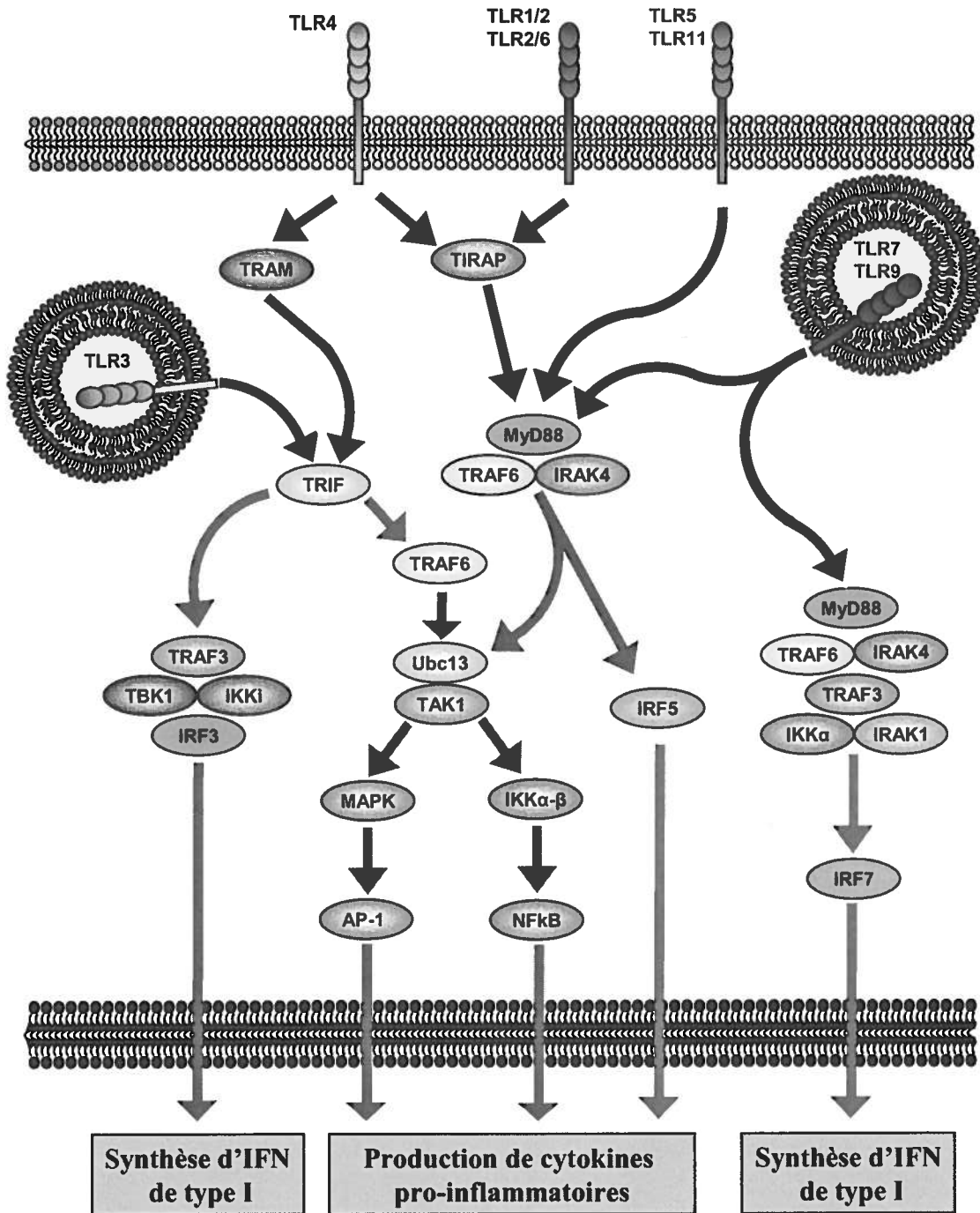
Le TLR11 reconnaît un composant du protozoaire *Toxoplasma gondii* apparenté à la profiline. Ce récepteur est exprimé par les cellules épithéliales de la vessie chez la souris et permet de lutter contre les infections urinaires induites par ce parasite (Zhang *et al.*, 2004). Le TLR11 semble également impliqué dans la résistance des souris à certaines souches uropathogènes de *E. coli*, mais dans ce cas son ligand est encore inconnu (Lauw, Caffrey et Golenbock 2005).

Les TLR1, 2, 4, 5, 6 et 11 sont exprimés à la surface des cellules phagocytaires (cellules dendritiques et macrophages principalement), mais les TLR3, 7, 8 et 9 sont exprimés dans des endosomes. Ceci s'explique notamment par le risque d'induction de maladies auto-immunes que présentent ces récepteurs. En effet, le LPS et la flagelline, reconnus par les TLR4 et TLR5 respectivement, sont des particules de nature exogène et leur présence dans l'organisme résulte forcément d'une infection. Mais il est possible de trouver chez les mammifères des séquences CpG non-méthylées d'ADN, reconnues par le TLR9, ou des ARNs, reconnus par les TLR7 et 8. Afin d'éviter une activation inopinée des macrophages, les TLRs spécialisés dans la reconnaissance d'acides nucléiques (TLR3, 7, 8 et 9) sont exprimés dans des compartiments intracellulaires alors que les TLRs spécialisés dans la reconnaissance de lipides (TLR1, 2, 4 et 6) ou de protéines (TLR5 et TLR11) sont exprimés à la surface de ces cellules. Cette ségrégation permet aux cellules phagocytaires d'assurer une surveillance des éléments phagocytés. Les macrophages peuvent ainsi faire la distinction entre l'ingestion de débris apoptotiques du soi et l'absorption d'éléments pathogènes exogènes comme les bactéries et les virus durant la maturation des phagosomes (Takeda et Akira 2005). La phagocytose et l'activation des TLRs sont en effet deux fonctions très liées.

3.3.2 - Signalisation via les TLRs

La transduction des signaux suite à l'engagement de récepteurs TLRs implique des éléments communs à plusieurs récepteurs notamment en ce qui a trait à l'association à la protéine adaptatrice MyD88 et à l'activation de la cascade signalétique qui en dépend. De fait, les signaux consécutifs à l'engagement de tous les récepteurs TLRs, à l'exception de TLR3, peuvent utiliser cette voie. La signalisation via ce dernier implique plutôt le recrutement de TRIF, qui peut aussi être impliqué dans la signalisation via TLR4. On parle donc de voies de signalisation dépendante ou indépendante de MyD88. (Jones *et al*, 2001; Kaisho et Akira 2006; Colonna 2007).

Le schéma simplifié présenté à la figure 3 illustre les différentes voies impliquant les TLRs. Ces différentes voies sont détaillées ci-dessous.



- Voie dépendante de TRIF
- Voie dépendante de MyD88
- Voie commune MyD88/TRIF

3.3.2.1 -La voie dépendante de MyD88

L'engagement des TLR1/2 & 2/6, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9 et TLR11 permet le recrutement de la protéine MyD88 de manière directe grâce à l'interaction mutuelle de leurs domaines TIR (Toll-interleukin 1 receptor), dans le cas des TLR5, TLR7, TLR9, TLR11 et TLR12, ou par l'intermédiaire de la protéine TIRAP (TIR domain containing adaptor protein) dans le cas des TLR4 et TLR1/2 & 2/6 (Kawai et Akira, 2007). L'association des TLRs à la protéine MyD88 permet le recrutement et l'activation de plusieurs protéines de la famille IRAK qui jouent un rôle essentiel dans l'activation de la voie dépendante de MyD88. La protéine MyD88 entraîne la phosphorylation et le recrutement des protéines IRAK4 et TRAF6 (TNF-R-associated factor 6). À cette étape, la signalisation progresse selon trois voies. La première voie implique l'activation directe de IRF-5 par le complexe IRAK4-TRAF6. Après translocation au noyau, le facteur de transcription IRF5 va contribuer, en collaboration avec le facteur NFκB, à initier la synthèse de cytokines. La seconde voie est celle des MAP kinases qui va entraîner l'activation du facteur de transcription AP-1. Dans la troisième voie, TRAF6 va activer l'IkB kinase (IKK) responsable de la dégradation de la protéine IkB. IkB va permettre la translocation nucléaire du facteur de transcription NFκB et son activation dans le noyau.

La voie dépendante de MyD88 est responsable de la phase précoce d'activation de NFκB, phase de production de cytokines pro-inflammatoires dont le TNF-α dans le cas des macrophages. Le TNF-α ainsi produit peut agir de manière autocrine et induire l'activation du facteur de transcription NFκB. Cette voie correspond à la phase tardive d'activation du NFκB et permet d'amplifier la durée et l'intensité de l'activation initiée par l'engagement des TLRs (revue par Kaisho et Akira 2006).

Dans le cas de TLR9 et possiblement de TLR7, la protéine IRAK1 activée par le complexe IRAK4-TRAF6 puis TRAF3, recruterait et activerait le facteur de transcription IRF7. Ce dernier serait responsable de la production d'IFN- α et d'IFN- β dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes activées via leurs TLR9, mais il y aurait essentiellement production d'IFN- β dans les cellules dendritiques myéloïdes et les macrophages activés via ce récepteur (Colonna 2007; Schmitz *et al.*, 2007).

3.3.2.2 - La voie indépendante de MyD88 mais dépendante de TRIF

L'engagement des récepteurs TLR3 et TLR4 avec leurs ligands respectifs va permettre le recrutement de la protéine TRIF, directement (dans le cas du TLR3) ou par l'intermédiaire de la protéine TRAM (dans le cas du TLR4). La protéine TRIF va activer spécifiquement les protéines TRAF3 et TRAF6. L'activation de TRAF6 va permettre, suite à une cascade d'activation de différents facteurs de transcription, la translocation nucléaire de NF κ B ainsi que l'activation de AP-1 à l'instar de la voie dépendante de MyD88. TRIF peut également activer directement la protéine TBK1 qui va elle-même activer le facteur de transcription IRF-3, responsable de la transcription de nombreux gènes dont ceux codant pour l'IFN- β et l'IL-10 (revue par Kawai et Akira 2007).

3.3.3 - Activation par les interférons

Les interférons (IFN) constituent une famille de cytokines dont les premiers membres ont été découverts grâce à leur capacité à rendre des cellules résistantes à une infection virale. Ils furent ainsi considérés comme la première ligne de défense de l'organisme. Leur rôle antiviral est bien caractérisé mais, 50 ans après la première description par Isaacs et Lindenmann, on découvre encore de nouvelles propriétés aux interférons (Isaacs et Lindenmann 1957; Isaacs, Lindenmann et Valentine 1957; Pestka 2007).

Il existe plusieurs types d'IFNs identifiés par des lettres grecques (IFN α , β , γ , δ , ϵ , etc) et définis selon leur homologie protéique et la nature des voies de signalisation qui sont activées lors de l'engagement de leurs récepteurs spécifiques. Les IFNs de type I et II activent l'ensemble des cellules du système immunitaire (Hertzog, O'Neill et Hamilton 2003).

La production d'interférons de type I est induite notamment par la présence de virus, de bactéries et de composés artificiels tels que l'ARN double brin synthétique ou l'imiquimod. Il existe une grande variété d'IFN de type I dont plusieurs sous types d'IFN- α (14 à 20 selon les espèces), les IFN- ω et τ et l'IFN- β . Les principales cellules productrices d'IFN- α sont les cellules dendritiques, les macrophages et certaines cellules hématopoïétiques. Les principales cellules productrices d'IFN- β sont essentiellement les fibroblastes lors d'une infection virale et, comme nous l'avons mentionné précédemment, les macrophages activés par l'engagement de certains TLRs (Schroder *et al.*, 2004; Bonjardim 2005; Pietras, Saha et Cheng 2006; Shirota *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2006). L'IFN- α et l'IFN- β sont tous les deux reconnus par le même récepteur, le récepteur hétérodimérique IFNAR (interferon alpha receptor). Une fois engagé, le récepteur IFNAR transmet un signal d'activation au noyau par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT (JAK1, TYK2 et STAT1, STAT2) (Bonjardim 2005).

3.3.3.1 - L'IFN- γ

L'interféron de type II, l'IFN- γ , est distinct des IFN de type I du point de vue structural et fonctionnel. Il est produit majoritairement par les cellules NK, T et NKT en réponse à des agents mitogènes ou à des cytokines comme l'IL-12. L'IFN- γ a notamment la propriété de réguler la prolifération, la différenciation et la survie des cellules qui lui sont sensibles.

L'IFN- γ est reconnu par le récepteur IFNGR (IFN- γ Receptor). Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de cytokines et est composé de deux chaînes, IFNGR1 et IFNGR2. La fixation de l'IFN- γ à son récepteur spécifique initie une cascade

de phosphorylation de type JAK/STAT impliquant les protéines JAK1, JAK2, STAT1 et STAT5. Une fois assemblés, les homodimères STAT1 phosphorylés vont pouvoir agir comme facteurs de transcription. Leur fixation aux promoteurs GAS (Gamma-Interferon Activation Site ; TTCN₍₂₋₄₎GAA) va permettre la transcription de gènes régulés par les interférons (IRG). Les homodimères STAT1 et les hétérodimères STAT1/5 peuvent activer les facteurs de transcriptions IRF9 et IRF1 qui à leur tour vont induire la transcription de nombreux gènes, dont ceux codant pour l'IFN- β , l'enzyme iNOS et la protéine STAT1 (revue par Schroder *et al*, 2004).

Si le terme « activation » signifie : « acquisition de compétence pour exécuter une fonction complexe », alors l'IFN- γ est le principal activateur du macrophage en condition d'inflammation. L'IFN- γ fût d'ailleurs originalement appelé facteur d'activation des macrophages. En effet, durant les réponses immunitaires naturelle ou acquise, les macrophages répondent à une grande variété d'activateurs cellulaires et de tous, l'IFN- γ est le plus important. Le signal transmis par l'IFN- γ entraîne, chez le macrophage, une augmentation de la présentation antigénique par les CMH de classe I et II, l'induction d'un état antiviral, l'inhibition de la prolifération cellulaire, une régulation du processus apoptotique, l'acquisition de fonctions effectrices microbicides, une modification des fonctions immunogènes, la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et enfin la migration des macrophages (revue par Schroder *et al*, 2004; Schroder, Sweet et Hume 2006).

3.3.3.2 - L'IFN- β

L'IFN- β peut réguler à lui seul la différenciation ou l'activation de la presque totalité des cellules du système immunitaire. Il peut polariser la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1, induire un signal de survie des cellules et favoriser l'apoptose des lymphocytes T (Hertzog, O'Neill et Hamilton 2003). L'IFN- β est la première ligne de défense antivirale. Produit par les cellules épithéliales en cas d'infection, il peut bloquer la synthèse des virions. Chez le macrophage, l'IFN- β joue un rôle prépondérant notamment comme amplificateur de signal. En effet, lorsque le macrophage est activé, même faiblement, celui-ci produit de l'IFN- β qui peut agir en circuit paracrine mais aussi autocrine. Ainsi les cellules avoisinantes et le macrophage lui-même perçoivent l'IFN- β qui va amplifier la réponse aux stimulations reçues par le macrophage. Un bon exemple

de ce mécanisme est la production de NO induite par la fixation de LPS sur le TLR4. Une fois le TLR4 engagé, celui-ci peut induire la synthèse d'IFN- β par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription IRF3 et la transcription du gène codant pour cette cytokine.

L'IFN- β ainsi produit va par la suite agir de manière autocrine sur le macrophage pour engendrer la production de iNOS (inductible NO synthase). La production d'IFN- β liée à l'engagement des TLRs a pour fonction d'amplifier la réponse immunitaire en favorisant un climat d'alerte environnant, en bloquant la réplication virale dans les cellules avoisinantes et en amplifiant les signaux transmis par l'engagement des TLRs (Takaoka et Yanai 2006). Le LPS peut à lui seul induire la production de NO par le macrophage, mais la présence d'IFN- β permet d'amplifier ce signal.

3.3.4 - Activation par d'autres cytokines

3.3.4.1 – Le TNF- α

Le TNF- α est une protéine homotrimérique produite par différents types de cellules du système immunitaire, mais principalement par les macrophages activés. Ses récepteurs spécifiques sont le TNF-R1 et TNF-R2 et leur engagement induit une cascade d'événements intracellulaires conduisant à l'activation de caspases et des facteurs de transcription NF κ B et c-Jun. L'activation de ces facteurs de transcription est responsable de l'induction de nombreux effets cellulaires dont notamment : la croissance cellulaire, l'apoptose, l'oncogenèse et l'induction d'une réponse pro-inflammatoire par les cellules du système immunitaire. Le macrophage, une fois activé, produit du TNF- α qui agira de façon paracrine et autocrine. Le TNF- α est un puissant activateur des macrophages et ses effets sont similaires aux effets induits par la fixation de l'IFN- γ . Puisque l'engagement de certains TLRs (comme le TLR4) avec leurs ligands induit la synthèse de TNF- α , celui-ci peut donc jouer un rôle d'amplification de la réponse en servant d'effecteur secondaire au même titre que l'IFN- β . La stimulation des macrophages avec du TNF- α entraîne une réponse pro-inflammatoire de type Th1 (Chen et Goeddel 2002; Mosser 2003; Mantovani, Sica et Locati 2007).

3.3.4.2 - L'IL-4

L'IL-4 partage avec l'IL-13 la capacité d'activer les macrophages par la voie alternative. Elles travaillent toutes deux de concert afin d'entraîner les macrophages ainsi que d'autres cellules du système immunitaire vers une réponse de type Th2. Il existe deux types de récepteurs pour l'IL-4 : les récepteurs hétérodimériques de type I, composés de la sous-unité IL-4R α et de la chaîne γ commune de l'IL-2R, et les récepteurs hétérodimérique de type II, composés des sous-unités IL-4R α et IL-13R α 1 (Ratthe *et al.*, 2007). Dans les macrophages, la fixation de l'IL-4 à son récepteur induit l'activation d'une cascade de kinases de la voie JAK/STAT. Une fois activé, le récepteur pour l'IL-4 va recruter les tyrosines kinases JAK1 et JAK3 qui vont par la suite phosphoryler et activer la protéine STAT6. Sous la forme activée, les protéines STAT6 vont s'homodimériser et pénétrer dans le noyau pour y jouer le rôle de facteur de transcription. STAT6 va induire la transcription de nombreux gènes dont les gènes codant pour l'IL-4, l'IL-4R α , l'IL-1R, les CMH de classe II et le CD23 (récepteur pour les IgE). L'IL-4 favorise la différenciation des lymphocytes T en cellules Th2, l'activation des lymphocytes B (notamment par l'activation de la commutation de classe des immunoglobulines) et l'engagement des macrophages vers une voie à médiation humorale, allergique et anti-parasitaire. L'IL-4 joue donc sur le macrophage, un rôle antagoniste à celui de l'IFN- γ et inversement la voie de l'IFN- γ interfère avec celle de l'IL-4 (revue par Becker et Daniel 1990; Paludan 1998; Gordon 2003).

3.3.4.3 – L'IL-10

L'IL-10 est produite par plusieurs types de cellules dont les cellules Th2, les lymphocytes B et les macrophages. L'IL-10 joue un rôle dans la désactivation du système immunitaire de l'hôte et c'est pour cette raison notamment que plusieurs virus dont le virus Epstein Barr ont dans leur génome un gène codant pour un homologue de cette protéine. La fixation de l'IL-10 à son récepteur entraîne l'inhibition de la présentation antigénique par les CPA, le blocage de la production de cytokines et l'expression de molécules de co-stimulation (CD80), des molécules de CMH de classe II et de l'enzyme

iNOS. Dans les macrophages péritonéaux, l'IL-10 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-12. Il a également été démontré que l'IL-10 inhibait la production de cytokines (IL-1, IL-6 et TNF- α) dans deux lignées de macrophages activées par le LPS ou par le LPS et l'IFN- γ (Fiorentino *et al.*, 1991; Oswald *et al.*, 1992; Pestka *et al.*, 2004).

Cependant, de récents travaux laissent entendre que l'IL-10 ne serait pas uniquement responsable d'une désactivation du système immunitaire. Il semblerait par exemple qu'elle favorise l'expression de molécules de CMH de classe II par les lymphocytes B et qu'elle favorise la réplication de ces cellules (Oswald *et al.*, 1992; Conti *et al.*, 2003; Pestka *et al.*, 2004). De plus, alors que l'IL-10 seule semble inhiber l'activité des cellules NK, la présence simultanée d'IL-10 et d'IL-18 favorise la cytotoxicité et la production d'IFN- γ par ces cellules (Cai, Kastelein et Hunter 1999).

L'IL-10 est reconnue par les cellules grâce à des récepteurs composés de deux sous-unités. La sous-unité IL-10R₂ est accessoire et est exprimée par la plupart des cellules. La sous-unité IL-10R₁ lie directement l'IL-10. IL-10R₁ est présente sur les cellules hématopoïétiques et est modulée à la hausse lorsque les macrophages sont activés. Une fois engagé, le récepteur de l'IL-10 va recruter les kinases JAK1 et TYK2 de la voie JAK/STAT qui vont elles-mêmes activer les protéines STAT1, STAT3 et STAT5. Il semblerait que le potentiel anti-inflammatoire du signal induit par l'IL-10 soit dû à l'activation de la protéine STAT3. Par ailleurs, l'IL-10 peut également induire l'activation de certaines fonctions de la cellule en favorisant l'homodimérisation des protéines STAT1 qui, une fois activées et dimérisées, vont pouvoir aller se fixer aux promoteurs GAS à l'instar du signal résultant de l'engagement de l'IFN- γ avec son récepteur (Pestka *et al.*, 2004). Ainsi il n'est pas étonnant que certaines études démontrent un effet synergique entre l'IFN- γ et l'IL-10, comme par exemple sur la production de NO, bien que cet effet semble dépendant du modèle cellulaire étudié (Chesrown *et al.*, 1994; Nemoto *et al.*, 1999).

3.3.5 - Effets synergiques

La réponse du macrophage face aux signaux d'activation engendrés par l'engagement des TLRs avec leurs ligands peut être amplifiée lorsque la cellule est préactivée en présence d'IFN- γ . Par exemple, la production de NO est amplifiée lorsque des macrophages dérivés de la moelle osseuse et stimulés avec du LPS sont préactivés avec de l'IFN- γ (Schroder, Sweet et Hume 2006). L'amplification mesurée est due au fait que les différentes voies de signalisation activées entraînent l'expression de nombreux gènes communs. Certains gènes ont dans leurs promoteurs des sites de fixation à la fois pour les facteurs de transcription STAT1 (de la voie IFN- γ) et NF κ B (de la voie des TLRs). Une synergie entre le LPS et l'IFN- γ peut également se manifester par l'intermédiaire de l'IFN- β ou du TNF- α . Par exemple, le LPS induit la production d'IFN- β par le macrophage et l'IFN- γ induit une augmentation de l'expression des récepteurs d'IFN- α/β . L'IFN- β produit en boucle autocrine aura donc un effet amplificateur sur le macrophage du fait que la concentration de cette cytokine et la quantité de ces récepteurs de surface seront augmentées. (Held *et al.*, 1999; Schroder, Sweet et Hume 2006).

3.4 - Les lignées de macrophages

Plusieurs lignées de macrophages murins ont été développées dont les lignées RAW 264.7, J774.1 et P388D1. Celles-ci s'avèrent d'excellents outils pour étudier les réactions des macrophages en présence de différentes molécules (cytokines, chimiokines ou autres agonistes), dans leur environnement. Plusieurs équipes ont démontré que les cellules RAW 264.7 expriment des gènes et des récepteurs semblables à ceux des macrophages primaires. Cette lignée constitue donc un bon modèle pour étudier les effets dose-réponse en présence de différents stimuli (Shepherd *et al.*, 2004; Lentschat *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006). Il a, par exemple, été démontré que l'IFN- β environnant influençait la production de NO par des macrophages RAW 264.7 activés par le LPS (Jacobs et Ignarro 2001). Les cellules RAW 264.7 sont également sensibles au TNF- α

(Ding et al., 1989), à l'IL-10 et à l'IL-4 (Nemoto et al, 1999), et bien sûr à l'IFN- γ (Kota et al., 2006). D'autre part, à l'exception de TLR8 qui n'est pas fonctionnel chez la souris, les macrophages de la lignée RAW264.7 expriment de manière fonctionnelle les récepteurs TLR1 à 9. (Plevy *et al.*, 1997; Derbigny, Kerr et Johnson 2005; Lentschat *et al.*, 2005; Broad, Kirby et Jones 2007; Pevsner-Fischer *et al.*, 2007). Les cellules RAW264.7 expriment également CD40, une molécule qui peut être modulée à la surface des macrophages en présence de LPS (Saxena, Vallyathan et Lewis 2003). Toutefois, il est bon de garder en mémoire qu'il s'agit d'une lignée cellulaire et que certaines de leurs caractéristiques ne sont peut-être pas partagées par les macrophages primaires. Cela étant dit, la lignée de macrophages RAW264.7 demeure un excellent outil de recherche que nous avons nous-mêmes utilisé pour étudier les effets de différentes cytokines et autres agonistes sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B.

4 - Le récepteur Ly49B

Cela fait déjà plusieurs années que le gène codant pour le récepteur Ly49B a été identifié (Wong *et al.*, 1991). Nous avons souligné, dans les sections 1 et 2 de la revue bibliographique, les particularités du gène *Ly49b* en ce qui a trait à sa localisation, la structure de sa région promotrice, sa plus faible homologie avec les autres membres de la famille et son niveau élevé de conservation par rapport au gène ancestral à partir duquel toute la famille *Ly49* s'est développée. Bien que le gène *Ly49b* ait été l'un des premiers de la famille Ly49 dont l'ADNc a été séquencé, le récepteur Ly49B est longtemps resté mystérieux. La non disponibilité d'un anticorps spécifique à ce récepteur a certainement contribué à la lenteur de sa caractérisation. Notre équipe a été la première à rapporter la sélection et le clonage d'un hybridome produisant un anticorps spécifique au récepteur Ly49B, l'anticorps 3LP218 (Lévesque 2002; Perrée 2003). Grâce à ce réactif, l'étude de l'expression et des propriétés du récepteur Ly49B a pu débuter (Perrée 2003).

Dès la découverte du gène codant pour le récepteur Ly49B, la simulation des alignements d'acides aminés avait permis de prédire la structure de ce récepteur. Celle-ci correspond à une protéine transmembranaire de type II comprenant un domaine cytoplasmique de 44 acides aminés, un domaine transmembranaire de 22 acides aminés et une portion extracellulaire de 222 acides aminés, elle-même constituée d'un tige et d'un domaine de reconnaissance des sucres (CRD) (Wong *et al*, 1991). À l'instar des autres récepteurs de la famille Ly49, le récepteur Ly49B se présente à la membrane sous la forme d'un homodimère dont les sous-unités, estimées à environ 45 kDa, sont rattachées entre elles par des ponts disulfures (Wong *et al*, 1991; Lévesque 2002; Perrée 2003). Les domaines cytoplasmique et transmembranaire du récepteur Ly49B sont très homologues à ceux des autres récepteurs Ly49 potentiellement inhibiteurs, incluant notamment la présence d'une séquence ITIM dont la phosphorylation sur tyrosine permet le recrutement de la protéine SHP-1, une propriété qui laisse supposer que le récepteur Ly49B serait fonctionnel (Wong *et al*, 1991; Perrée 2003). Cependant, le récepteur Ly49B se distingue sensiblement des autres membres de la famille Ly49 dans sa portion extracellulaire puisque 97 des 222 résidus qui la constituent sont spécifiques à ce récepteur aux positions où ils se trouvent, la majorité des particularités observées étant localisées dans le CRD, principal site d'interaction des récepteurs Ly49 avec leurs ligands. Par exemple, la portion extracellulaire du récepteur Ly49B inclut un prolongement d'une vingtaine d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale, une extension que ne possède aucun autre récepteur Ly49 (Wong *et al*, 1991). Le rôle éventuel de cette extension dans la liaison à un ligand n'a pas encore pu être étudié puisque le récepteur Ly49B demeure pour l'instant un récepteur orphelin pour lequel aucun ligand n'a été identifié.

Compte tenu des particularités du récepteur Ly49B par rapport aux autres récepteurs de la famille, il n'est pas étonnant que celui-ci ait une distribution particulière. Utilisant l'anticorps monoclonal 3LP218 (Lévesque 2002), notre équipe a pu établir que contrairement à la majorité des autres récepteurs Ly49, le récepteur Ly49B n'était pas exprimé par des cellules lymphocytaires (cellules NK, NKT, lymphocytes T ou B) (Perrée 2003). Il est cependant présent sur 25 à 40% des cellules de la moelle osseuse. En identifiant les cellules Ly49B⁺ de la moelle osseuse comme étant des cellules de grande

taille et de forte granularité qui co-expriment les protéines CD11b (Mac-1) et Gr-1 (Ly6G), l'association de ce récepteur à la lignée myéloïde a pu être établie. Le suivi de l'expression du récepteur sur les cellules de la cavité péritonéale de souris ayant préalablement reçu une injection de thioglycollate, a ensuite permis de prouver que le récepteur Ly49B était exprimé sur les polynucléaires neutrophiles et sur les macrophages matures. Utilisant finalement comme modèles d'étude les lignées de macrophages RAW264.7 et J774A.1, l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B lors de l'activation des cellules via des récepteurs empruntant différentes voies de signalisation a été démontrée (Perrée 2003).

La conservation du gène *Ly49b* au cours de l'évolution, la présence du récepteur qu'il code à la surface de cellules qui interviennent dans l'immunité innée et acquise et le caractère inductible de son expression dans différentes conditions d'activation sont autant d'observations qui suggèrent que le récepteur Ly49B puisse avoir à jouer un rôle important dans la biologie des cellules de la lignée myéloïde.

5 - Objectifs du projet

Nous émettons l'hypothèse que le récepteur Ly49B puisse notamment intervenir dans la modulation de certaines propriétés fonctionnelles du macrophage. Le caractère inductible de son expression en conditions d'activation pourrait être le reflet d'un besoin de régulation de la cellule. Les expérimentations qui seront exposées dans les prochains chapitres avaient pour objectifs : de préciser les circonstances dans lesquelles une expression accrue du récepteur Ly49B à la surface des macrophages se manifeste, d'évaluer le rôle inhibiteur du récepteur Ly49B dans un contexte contrôlé de co-engagement via un récepteur d'activation et de comparer l'abondance relative et la dispersion du récepteur Ly49B dans des macrophages activés et non activés. Les observations exposées dans le chapitre IV seront ensuite discutées dans le contexte des nouvelles données rapportées dans la littérature depuis le moment où ces expérimentations ont débuté.

III- MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - Maintien en culture de la lignée RAW 264.7

La lignée de cellules RAW 264.7, TIB71 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginie, USA) généreusement donnée par le Dr Albert Descoteaux (INRS-Institut Armand-Frappier), est une lignée tumorale de monocytes/macrophages issue de la souris BALB/c. Les cellules ont été maintenues dans du milieu DMEM high glucose avec L-glutamine, additionné de 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 10 ml d'HEPES 1M (DMEMc). Le milieu de culture a aussi été enrichi de 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Tous les suppléments provenaient de Gibco (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), sauf l'HEPES qui provenait de Fisher (Pittsburgh, Pennsylvania, USA).

Les cellules ont été maintenues à 37°C dans un atmosphère humide contenant 5% CO₂, à une concentration cellulaire inférieure à 16 x 10⁶ cellules par boîte de Petri (100x15mm) afin d'éviter la confluence qui entraîne l'activation des macrophages. Les passages ont été effectués tous les 2 ou 3 jours. Des cellules fraîches ont été décongelées après 12 à 15 passages. Seules les cultures ayant une viabilité supérieure à 90% ont été utilisées.

2 - Agonistes, cytokines et anticorps

Le lipopolysaccharide (LPS) isolé à partir de la souche O127:B8 de *Escherichia coli* a été obtenu de chez Sigma (Oakville, Ontario, Canada). Le Poly(I:C) ainsi que la trousse d'agonistes de TLR (TLR1-9 Agonist Kit de InVivoGen (San Diego, California, USA)) de même que les cytokines IL-4, IL-10 et IL-12 ont été achetés chez Cedarlane (Burlington, Ontario, Canada). Les cytokines recombinantes de souris IFN-γ, IFN-β et IL-

18 de même que l'anticorps anti-CD40 (clone 1C10) et les anticorps polyclonaux de lapin anti-IFN- β provenaient de R&D Systems (Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada). Les fragments F(ab')₂ d'IgG de chèvre spécifiques du fragments Fc des IgG de rat ont été achetés chez Cedarlane. Les anticorps monoclonaux de rat 3LP218 anti-Ly49B, 4D11 anti-Ly49G2 et 2.4G2 anti-Fc γ RII/Fc γ RIII ont été produits à partir d'hybridomes obtenus de l'ATCC (4D11 et 2.4G2) ou développés dans notre laboratoire.

3 - Culture des hybridomes et production des anticorps

L'hybridome 3LP218 a été développé dans notre laboratoire à partir de splénocytes de rat F-344 fusionnés avec les cellules myélomateuses P3X63Ag8.653 (Lévesque 2002). Le rat avait été immunisé avec des cellules Jurkat humaines transfectées avec l'ADNc du récepteur murin Ly49B. Les anticorps sécrétés par cet hybridome sont des IgG2b (Perrée 2003). Pour la production des anticorps, les cellules des hybridomes 3LP218, 4D11 et 2.4G2 ont été cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 complet additionné de 10% de SVF en maintenant la concentration à 1×10^6 cellules/ml jusqu'à l'obtention d'une culture d'environ un litre. Les flacons de culture ont alors été laissés dans l'incubateur jusqu'à ce que la viabilité cellulaire baisse à 20%. Le surnageant de culture a alors été récolté, centrifugé à 4°C pendant 20 min à 6300 x g puis concentré environ 10X à l'aide d'un système Amicon en utilisant une membrane 100K (Filtron Technology Corporation, Northboro, Mass. USA). Les anticorps 3LP218 et 4D11 ont été purifiés sur une colonne de protéine G Sepharose™ 4 Fast Flow (PGS; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, New Jersey, USA). Les immunoglobulines ont été éluées avec un tampon d'éluion (CH₃COONH₄ 0,5 M à pH 3,0) et le pH a été réajusté à environ 7,0 avec une solution de tris-HCl 1 M à pH 8,8. La solution d'anticorps a ensuite été concentrée avec le système Amicon sur une membrane 50K et dialysée dans du PBS à pH 7,4 ou dans un tampon adéquat pour la biotinylation. La concentration de la solution d'anticorps a finalement été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant la densité optique de la solution à une longueur d'onde de 280 nm. Sachant qu'à cette

longueur d'onde, une densité optique de 1,4 équivaut à 1 mg d'immunoglobuline par ml, la concentration de l'anticorps a pu ainsi être calculée. Les anticorps 2.4G2 étant utilisés comme bloqueurs, il n'était pas nécessaire de les purifier.

4 - Biotinylation des anticorps

La solution d'anticorps a tout d'abord été dialysée contre une solution de carbonate de sodium (NaHCO_3 0,1 M à pH 8,0-8,3). La concentration de l'anticorps a ensuite été ajustée à 1 mg/ml. L'ester de biotine (N-hydroxysuccinimidobiotine; Sigma) a été dissout à 1 mg/ml dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO; Fisher). Pour chaque ml de la solution d'anticorps, 120 μl de cette solution de biotine ont été ajoutés et le tout a été incubé 2 h à la température de la pièce et à l'obscurité. Pour terminer, l'anticorps a été dialysé contre un tampon PBS à pH 7.4 pendant 24 h en changeant le tampon à trois reprises pour éliminer la biotine libre. Pour la conservation, 0,1% d'azide de sodium a été ajouté à la solution d'anticorps. Finalement, la concentration de l'échantillon a été déterminée avec un spectrophotomètre tel que décrit précédemment.

5 - Protocoles d'activation des macrophages

5.1 Par des cytokines ou des agonistes

Les cytokines ou les agonistes ont été solubilisés dans du DMEMc-10% aux concentrations indiquées dans chaque expérience puis des échantillons ont été distribués dans les boîtes de Petri en X (VWR, Mississauga, Ontario, USA) à raison de 1 ml/quart de boîte. Dans certaines expériences, des anticorps neutralisants de lapin anti-IFN- β ont été ajoutés aux solutions d'agonistes ou de cytokines. Les macrophages récoltés à partir des cultures de maintien ont été suspendus dans le même milieu à la concentration de 1 x

10^6 cellules viables/ml puis des échantillons de 1 ml/quart de boîte ont été distribués dans les boîtes de Petri en X contenant déjà les cytokines ou les agonistes. Les macrophages ainsi activés ont été incubés pendant 16 à 18 h dans les mêmes conditions que pour les cultures de maintien. Les cellules ont ensuite été récoltées puis marquées conformément au protocole de marquage pour la cytométrie en flux.

5.2 - Par des anticorps immobilisés

Des échantillons de 50 μ l contenant des fragments $F(ab')_2$ de chèvre anti-Fc d'IgG de rat à la concentration de 1,3 mg/ml ont été distribués dans les puits d'une microplaque de 96 puits à fonds plats (Costar, Lowell, Massachusetts, USA) qui a été gardée à la température de la pièce pendant 1 h. Les protéines non fixées aux puits ont été éliminées et les puits ont été lavés avec du PBS sans calcium ni magnésium (+ 0,1% Azide et 1% SVF). Des volumes de 50 μ l contenant des concentrations variables d'anticorps anti-CD40, anti-Ly49B et/ou anti-Ly49G2 (utilisé à titre de témoin isotypique) ont été distribués dans les puits de la microplaque qui a été incubée durant une nuit à 4°C. Le lendemain, les puits de la microplaque ont été lavés d'abord avec du PBS puis avec du milieu DMEMc-10%. Des cellules RAW 264.7, cultivées pendant 16 à 18 h en présence de concentrations variables d'IFN- γ , ont été suspendues dans du DMEMc-10% à la concentration de 3×10^5 cellules viables/ml. Des échantillons de 100 μ l ont alors été distribués dans les puits tapissés d'anticorps et la microplaque a été incubée de nouveau 16 à 18 h à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le protocole d'activation des macrophages dans un contexte de co-engagement de récepteurs activateurs et inhibiteurs par des anticorps immobilisés est schématisé dans la figure 4.

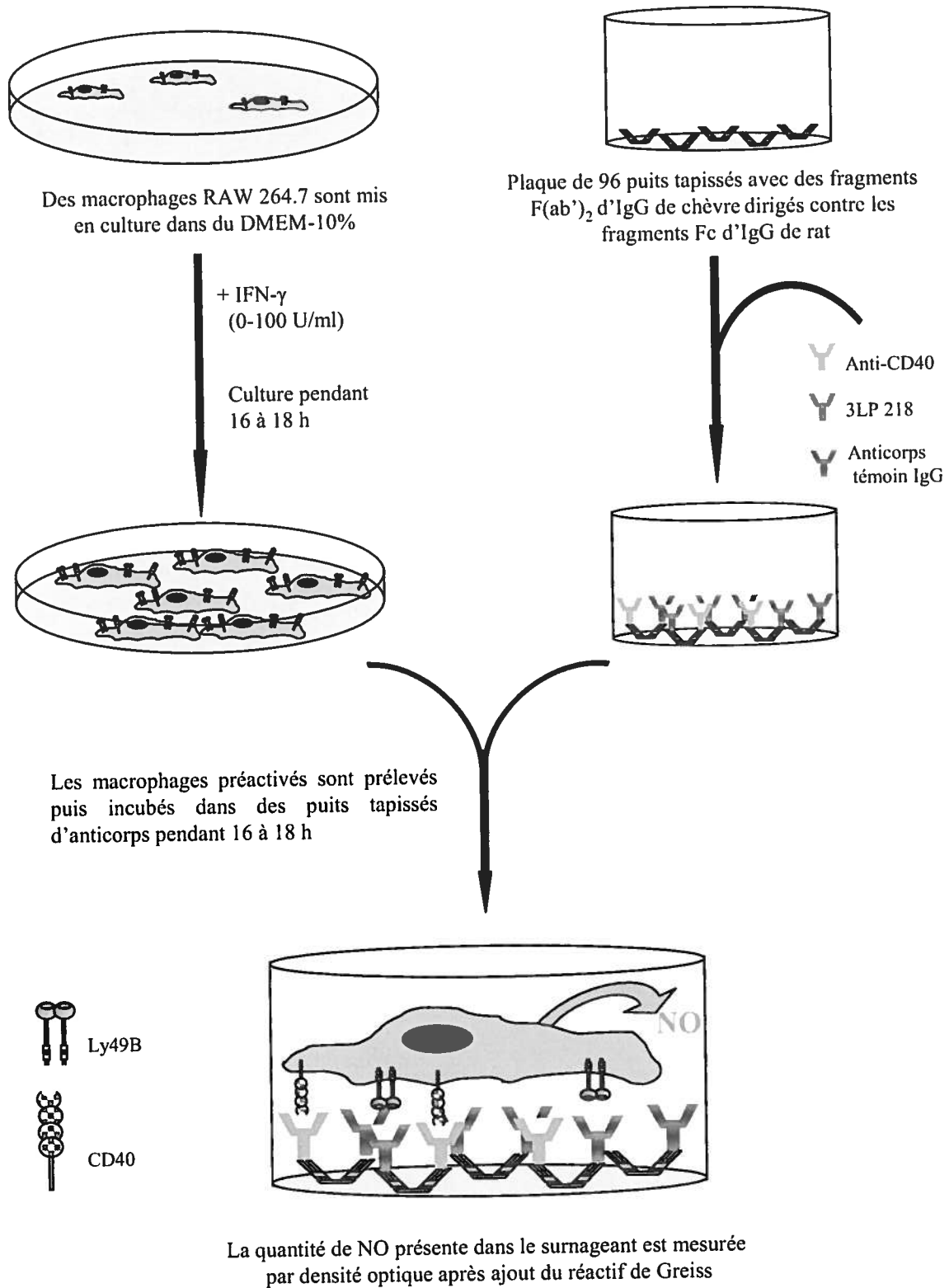


Figure 4: Protocole d'activation des macrophages par co-engagement de récepteurs activateurs et inhibiteurs par des anticorps immobilisés

6 - Dosage de l'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique (NO) libéré par une cellule peut être mesuré à l'aide de la réaction de Griess. Le réactif de Griess est composé de deux solutions mélangées (1:1) au moment de l'expérience. Solution 1 : sulfanilamide 1% (Sigma) et acide phosphorique 2,5% (Fisher). Solution 2 : N(1-Naphtyl)éthylènediamine 0,1% (Sigma). Le test mesure la présence du nitrate qui est un produit stable du métabolisme du NO.

Le lendemain de l'activation des macrophages par des anticorps immobilisés, 60 µl de surnageant par puits ont été récoltés à partir de chaque puits et transférés dans une plaque de 96 puits à fond plats. Le réactif de Griess a été ajouté à raison de 30 µl par échantillons puis le mélange a été laissé à la température de la pièce et à l'obscurité pendant 30 min. À la fin de la période d'incubation, la densité optique de chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA (Microplate Autoreader EL309; Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, USA) à une DO de 570 nm. La comparaison des densités optiques obtenues pour chaque échantillon avec une courbe standard de NaNO_2 permet de calculer la concentration de NO de chacun.

7 - Cytométrie en flux

Le milieu utilisé pour les marquages cellulaires était du PBS sans calcium ni magnésium (Gibco), supplémenté avec 1% de SVF et 0,2% d'azide de sodium (NaN_3 ; Fisher). Les cellules récupérées après activation ont été marquées à raison de 4×10^5 cellules par tube. Les récepteurs FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16) ont d'abord été bloqués avec l'anticorps monoclonal 2.4G2 (ATCC HB197) et un anti-CD64 polyclonal (N-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). Du

surnageant de culture de l'hybridome 2.4G2, concentré 10x supplémenté avec de l'anti-CD64 (200 µg/ml, 1:100) a été ajouté aux cellules à raison de 50 µl par tube. Le blocage s'est fait à 4°C durant 15 min. L'anticorps 3LP218 ou un isotype IgG2b, tous les deux conjugués à de la biotine (0,5 mg/ml BD pharmingen, Mississauga, Ontario, Canada), ont été ajoutés à la suspension de cellules en quantité égale. Les échantillons ont été incubés 15 min à 4°C. Après deux lavages au PBS de marquage, le conjugué Streptavidine PE-Cy-Chrome™ (SAPE-Cy5, BD Pharmingen, 100 µg/ml) a été ajouté aux cellules et les échantillons ont été incubés 20 min à 4°C. Après deux lavages, les cellules ont été fixées dans une solution de paraformaldéhyde 1% dans du PBS.

L'évaluation de la fluorescence des échantillons a été faite à l'aide d'un cytomètre FACS Calibur (BD Bioscience) et les résultats ont été analysés avec le programme Cell Quest Pro (BD Bioscience). Les données recueillies correspondent à l'analyse d'au moins 5000 événements par échantillon. Un exemple de la méthode d'analyse des résultats est présenté à la figure 5.

8 - Microscopie confocale

Des cellules RAW 264.7 ont été incubées à 37°C + 5% CO₂ sur des lamelles de verre stériles dans des puits de plaques 24 puits à raison de 1×10^5 cellules dans 0,5 ml de DMEMc-10% par puits. Après 3 h, le surnageant a été aspiré et remplacé par du DMEMc-10% contenant 100 U/ml d'IFN-γ pour un volume final de 0,5 ml. Les cellules ont été incubées de 16 à 18 h à 37°C dans une atmosphère contenant 5% CO₂. Les cellules ont ensuite été fixées avec de la paraformaldéhyde 1%. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec 0,1% de Triton X-100 et la fixation non spécifique des anticorps due aux récepteurs Fc de surface a été bloquée à l'aide d'une solution composée de 1% BSA, 20% de sérum de chèvre, 6% de lait et 50% de SVF. Après deux lavages avec du PBS, les cellules ont été incubées pendant 1 h à l'obscurité avec les anticorps primaires (3LP218 ou isotype IgG2b). Après une autre série de lavages avec du PBS, les cellules

ont été incubées pendant 1 h à l'obscurité avec les anticorps secondaires, soit des anticorps de chèvre dirigés contre les IgG2b de rat couplés au fluorochrome AlexaFluor (488). Dès échantillons ont également été marqués avec de la Phalloïdine (568) afin de visualiser les filaments d'actine, du DRAQ5 (647) afin de visualiser les noyaux ou une combinaison des trois fluorochromes. Après une autre série de lavages, les lamelles ont été fixées à des lames à l'aide de Fluoromount G. Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope confocal (Nikon Eclipse E800). Les fluorochromes ont été excités à l'aide d'un LASER Argon-Krypton 10 mW pour les longueurs d'excitation de 488 et 568 nm ou d'une diode LASER de 10 mw pour les longueurs d'onde d'excitation de 638 nm. Les images ont été obtenues grâce au programme LaserSharp software (Bio-Rad Laboratories) puis analysées avec le programme AdobePhotoshop 6.0.

IV -RÉSULTATS

1- Modulation de l'expression du récepteur Ly49B à la surface des cellules RAW 264.7

Tel que mentionné dans la revue bibliographique, les macrophages ont la capacité de répondre à de nombreux stimuli présents dans leur environnement et le type de réponse induite dépend de la nature de ces stimuli. Microorganismes, cytokines, chimiokines et contacts avec les cellules environnantes sont autant d'éléments qui régulent les propriétés fonctionnelles des macrophages de même que l'expression de leurs récepteurs et de leurs marqueurs phénotypiques. Bien que chaque agoniste induise un type d'activation qui lui est propre, les réponses à différents agonistes peuvent être semblables car les voies empruntées par les signaux engendrés suite à l'engagement de différents récepteurs sont souvent communes.

Dans le cadre de sa maîtrise, un autre étudiant de notre laboratoire avait rapporté l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B à la surface des macrophages de la lignée RAW 264.7, cultivés en présence de 100 U/ml d'IFN- γ , de 100 ng/ml de LPS ou de 20 μ g/ml de Poly(I:C) (Perrée 2003). Ces doses sont connues pour activer plusieurs propriétés du macrophage notamment la production de cytokines, de chimiokines, de dérivés toxiques de l'oxygène ou de l'azote, ainsi que la modulation de récepteurs de surface et la présentation d'antigène.

La poursuite de l'étude des stimuli qui induisent une modulation de l'expression du récepteur Ly49B à la surface des macrophages devrait nous permettre de déterminer dans quelles circonstances le récepteur inhibiteur Ly49B est requis par ces cellules, de comparer l'efficacité relative des activateurs qui engendrent son expression et éventuellement d'identifier un ou des facteurs qui participent à sa modulation. Le principal objectif de ce mémoire était de mieux cerner les conditions qui régissent l'expression du récepteur inhibiteur Ly49B à la surface des macrophages. À cet effet,

nous avons d'abord voulu établir des courbes dose-réponse pour chacun des activateurs déjà identifiés. En plus de déterminer les doses minimales effectives, nous voulions aussi savoir si les niveaux d'expression atteints aux doses optimales étaient identiques pour ces trois agonistes. Nous avons ensuite évalué la modulation de l'expression du récepteur Ly49B dans d'autres conditions d'activation des macrophages, notamment via des TLRs qui stimulent des voies signalétiques différentes. Les résultats obtenus dans ces expériences nous ont amenés à explorer le rôle inducteur ou régulateur que pourraient jouer, dans la modulation de l'expression du récepteur Ly49B, différentes cytokines produites dans le cours d'une réponse immunitaire innée ou acquise.

Des cellules de la lignée RAW 264.7 ont été utilisées pour toutes les expériences rapportées dans ce mémoire. La modulation de l'expression du récepteur Ly49B a été évaluée par cytométrie en flux après marquage des cellules avec un anticorps anti-Ly49B (3LP218) ou un témoin isotypique (rat IgG2b) biotinylés. Le taux de fixation des anticorps a été révélé à l'aide d'un conjugué SAPE-Cy5.

Le protocole détaillé décrit dans la section méthodologie précise que nous avons fixé à 16 h à 18 h le temps d'incubation des cellules en présence des différents agonistes. Des expériences préliminaires effectuées avec des cellules cultivées de 4 à 48 h en présence de 100 U/ml d'IFN- γ nous avaient permis d'observer une réponse croissante selon le temps de culture (résultats non illustrés). Cependant, la viabilité des cellules étant réduite dans les cultures de 48 h et la différence de réponse étant assez faible entre 16 et 24 h, nous avons opté pour la période de 16 h à 18 h, celle-ci étant plus pratique compte tenu des manipulations préalables aux analyses par cytométrie en flux.

La figure 5 illustre la méthode utilisée pour calculer les données. L'expression d'un récepteur à la surface d'une cellule peut beaucoup varier, notamment en fonction des conditions de culture, du nombre de passages subis par la lignée, de la puissance de l'agent activateur et de la viabilité des cellules au moment du prélèvement. Aussi, avons-nous d'abord établi des conditions expérimentales qui réduisent au minimum les effets attribuables à des facteurs autres que la nature et la concentration de l'agent activateur utilisé.

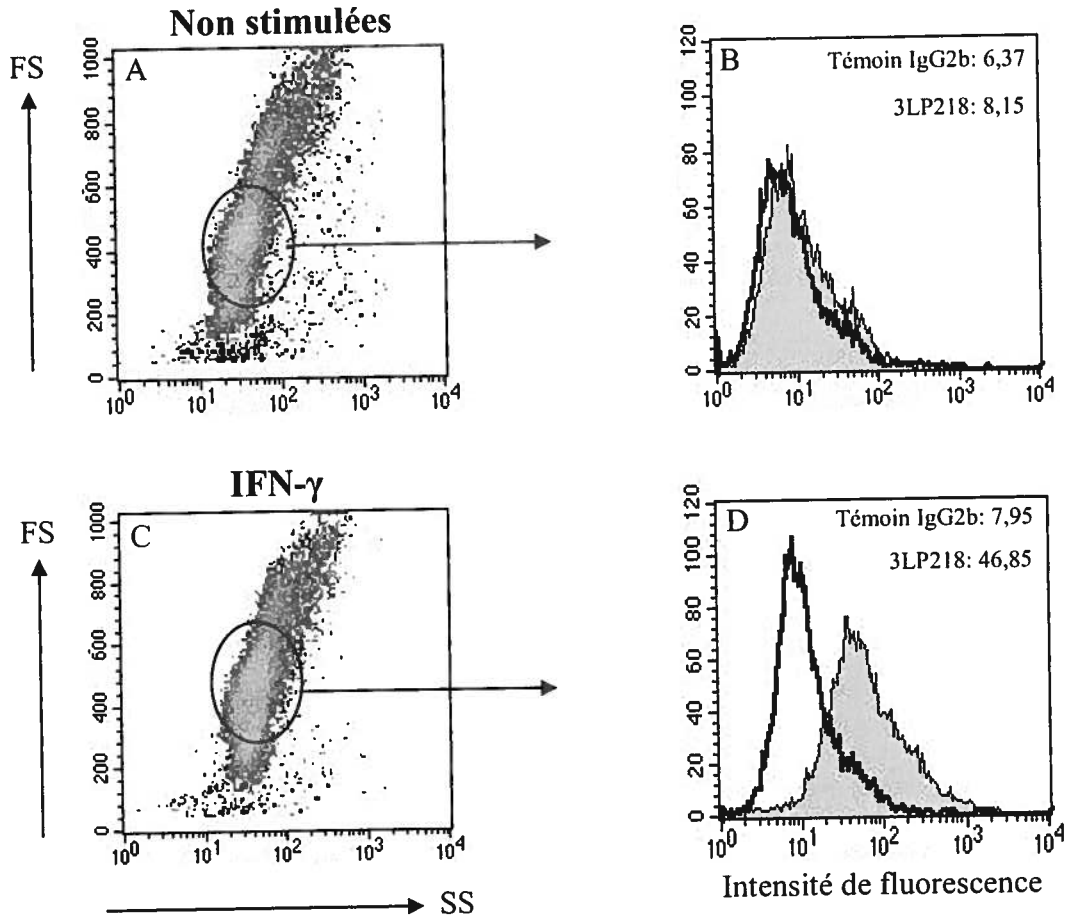


Figure 5: Méthode d'évaluation de la modulation de l'expression du récepteur Ly49B à la surface des macrophages de la lignée RAW 264.7

Les cellules RAW 264.7 ont été cultivées en absence (Figures A et B) ou en présence (Figures C et D) d'un agent activateur, de l'IFN- γ 100 U/ml dans l'exemple illustré. Après 16 à 18 h, les cellules ont été incubées avec l'anticorps 3LP218 (anti-Ly49B, zones ombrées des fig. B et D) ou un anticorps isotypique (zones claires des fig. B et D) conjugués à la biotine puis avec un conjugué SAPE-Cy5. Le niveau basal d'expression du récepteur Ly49B sur la population de cellules encerclée dans la figure A correspond à la différence d'intensité moyenne de fluorescence (MFI) en base log entre les deux réactifs (valeurs indiquées en haut à droite dans la Fig. B). Cette donnée sert de dénominateur pour calculer l'augmentation de l'expression du récepteur attribuable à l'agent activateur, le niveau d'expression étant calculé de la même manière (Fig. C et D). Le facteur d'expression calculé dans l'exemple illustré est de 21,8X soit $(46,85 - 7,95) / (8,15 - 6,37)$.

De plus, les cellules RAW 264.7 étant des macrophages, elles expriment plusieurs types de récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines (FcR) et ceux-ci sont modulables lorsque la cellule est activée (revue par Ravetch et Bolland 2001). L'efficacité de leur blocage devait constamment être prise en compte dans l'analyse des résultats. De même nous avons noté dans des expériences préliminaires qu'à confluence, les contacts intercellulaires étaient suffisants pour induire la modulation du récepteur Ly49B (résultats non illustrés). La modulation de l'expression du récepteur Ly49B dans différentes conditions d'activation sera donc exprimée sous la forme de « facteurs d'expression » (FE) calculés en référence au niveau basal d'expression du récepteur Ly49B à la surface de cellules cultivées à basse concentration pour éviter que l'effet dû aux agents activateurs soit indûment amplifié si ceux-ci induisent la prolifération des cellules. Les mesures ont été effectuées comme décrit dans la légende de la figure 5. Selon les expériences, la zone d'intérêt incluait de 70 à 90% des cellules de l'échantillon. On note une légère augmentation de la fixation de l'anticorps témoin tel qu'attendu en raison de l'augmentation de l'expression des FcR dans les conditions d'activation utilisées dans l'exemple illustré (revue par Ravetch et Bolland 2001).

1.1 - Modulation de l'expression du récepteur Ly49B par l'IFN- γ , le LPS et le Poly(I:C)

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées dans du milieu contenant des concentrations variables d'IFN- γ , de LPS ou de Poly(I:C). Les gammes utilisées pour chaque agoniste incluaient des valeurs supérieures et inférieures à celles considérées optimales pour l'activation de différentes propriétés des cellules de cette lignée (Salkowski et Vogel 1992b, a; Kim et Son 1996; Watters *et al.*, 2002). Les résultats illustrés dans les figures 6, 7 et 8 correspondent à la moyenne de 3 à 9 expériences.

Pour chacun de ces agonistes, nous avons identifié des concentrations auxquelles la modulation de l'expression du récepteur Ly49B est dépendante de la dose jusqu'à l'atteinte d'un plateau. Ces concentrations dose-dépendantes se situent entre 6,25 et 100 U/ml pour l'INF- γ (soit entre 1,25 ng/ml et 20 ng/ml), entre 0,25 et 10 ng/ml pour le LPS

Facteur
d'expression

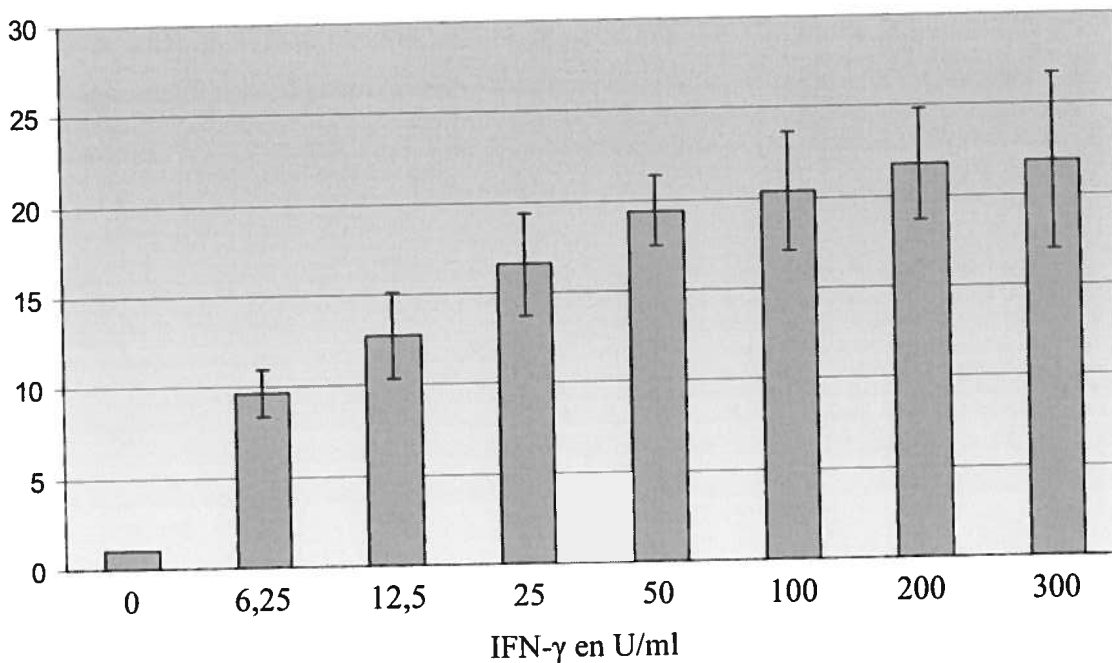


Figure 6: Modulation de l'expression du récepteur Ly49B par l'IFN- γ

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différentes concentrations d'IFN- γ selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Les cellules récoltées ont été marquées à l'aide de l'anticorps anti-Ly49B 3LP218 ou d'un anticorps isotypique biotinylés. La fluorescence a été révélée à l'aide d'un conjugué SAPE-Cy5. Les facteurs d'expression ont été calculés par rapport au niveau basal d'expression du récepteur sur les cellules cultivées en absence de cytokine en utilisant la méthode décrite dans la figure 5. Les valeurs illustrées correspondent à la moyenne de 4 à 6 expériences.

Facteur
d'expression

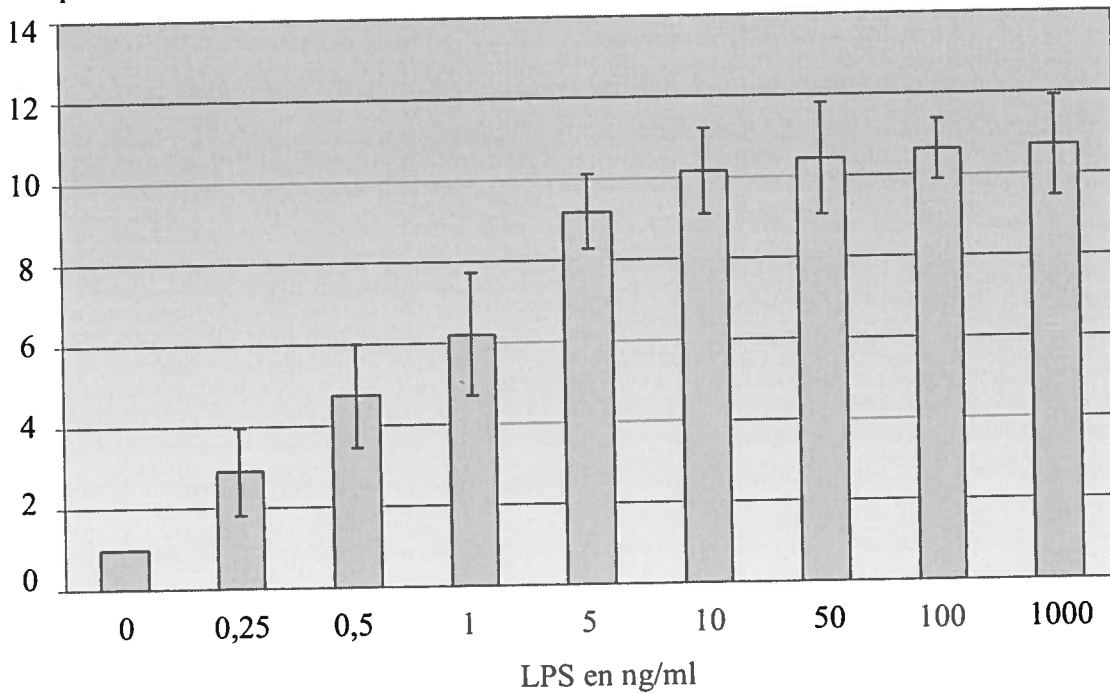


Figure 7: Modulation de l'expression du récepteur Ly49B par le LPS

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différentes concentrations de LPS selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faits de la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées correspondent à la moyenne de 4 à 9 expériences. Des échantillons témoins cultivés en présence d'IFN- γ (100 U/ml) ont été ajoutés dans chaque expérience. Le facteur moyen d'expression du récepteur Ly49B sur les cellules ainsi activées était de $20,24 \pm 3,66$.

Facteur
d'expression

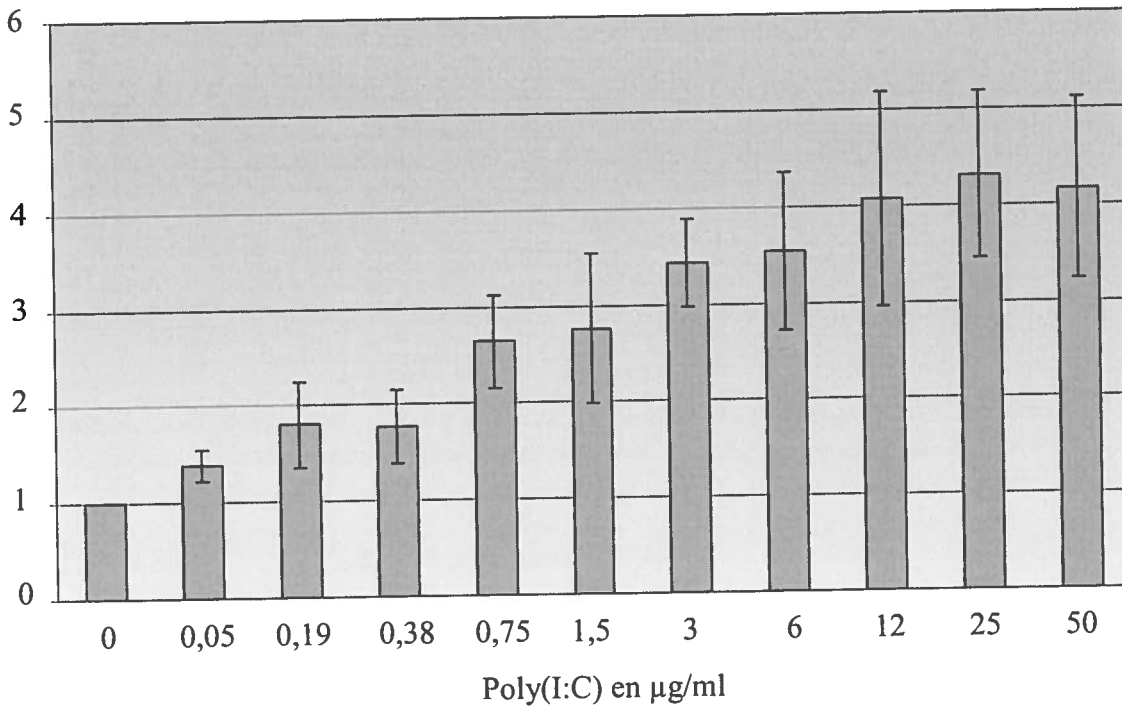


Figure 8: Modulation de l'expression du récepteur Ly49B par le Poly(I:C)

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différentes concentrations de Poly(I:C) selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faits de la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées correspondent à la moyenne de 3 à 7 expériences. Des échantillons témoins cultivés en présence d'IFN- γ (100 U/ml) ont été ajoutés dans chaque expérience. Le facteur moyen d'expression du récepteur Ly49B sur les cellules ainsi activées était de 19,10 +/- 3,96.

et entre 0,05 et 12 $\mu\text{g/ml}$ pour le Poly(I:C). Pour chacun de ces agonistes, nous avons aussi identifié une zone plateau dans laquelle l'augmentation de la concentration de l'agoniste d'un facteur 3 (IFN- γ), 4 (Poly(I:C)) ou même 100 (LPS) ne change pas l'effet obtenu. L'IFN- γ est de loin le facteur qui module le plus efficacement l'expression du récepteur Ly49B (Fig. 6). En conditions optimales, le niveau d'expression du récepteur est 20 fois plus élevé que sur les cellules cultivées en absence de cytokine. Une concentration d'IFN- γ 16 fois inférieure à la dose de 100 U/ml, souvent utilisée comme dose de référence dans l'activation du macrophage, entraîne une augmentation du niveau d'expression du récepteur Ly49B pratiquement du même ordre que l'augmentation observée à la dose optimale de LPS (10 ng/ml) dont l'effet est cependant deux fois plus faible qu'avec l'IFN- γ (Fig. 6 et 7). L'effet du Poly(I:C) est nettement moins marqué qu'avec les deux autres agonistes. Ainsi, l'effet optimal du Poly(I:C), obtenu à la concentration de 12 $\mu\text{g/ml}$, est légèrement inférieur à l'augmentation observée à une concentration de 0,5 ng/ml de LPS, soit une concentration 20 fois plus faible qu'à sa concentration optimale. L'expression du récepteur Ly49B étant peu affectée par le Poly(I:C), les écarts type sont plus importants pour les valeurs déterminées en présence de concentrations d'agoniste qui se situent dans la zone plateau. L'ensemble de ces résultats démontrent que l'expression du récepteur Ly49B, à la surface des macrophages en culture, est modulable par de faibles concentrations d'agonistes et que l'amplitude de la réponse varie selon les activateurs présents dans le microenvironnement cellulaire. Ces observations suggèrent que l'augmentation du niveau d'expression de ce récepteur inhibiteur puisse, en fait, être requise pour limiter la réponse du macrophage à certains stimuli et que cela survienne de manière plus ou moins marquée, selon la nature et l'intensité de la stimulation reçue.

1.2 - Modulation comparée de l'expression du récepteur Ly49B suite à l'activation des macrophages via différents TLRs

L'IFN- γ est considéré comme l'activateur principal du macrophage. Dans le contexte d'une réponse immunitaire, cet interféron de type II est produit rapidement par les cellules NK et NKT activées ou plus tardivement par les lymphocytes T activés. Le LPS et le Poly(I:C) sont par ailleurs des agonistes de récepteurs de la famille des TLRs

qui compte plusieurs autres membres (voir la section 3.3.1 de la revue bibliographique). Bien que tous les TLRs reconnaissent des structures qui ont été conservées à la surface des microorganismes pathogènes au cours de l'évolution et qui de ce fait, jouent un rôle majeur dans l'immunité innée, les signaux produits par leur engagement empruntent des voies qui peuvent être semblables ou distinctes (voir Fig.3). Dès lors, il nous a paru intéressant d'évaluer si l'activation des cellules RAW 264.7 via des récepteurs TLRs autres que ceux engagés par le LPS ou le Poly(I:C), qui sont respectivement des agonistes de TLR4 et de TLR3, pouvait également entraîner la modulation de l'expression du récepteur Ly49B à leur surface. Pour réaliser ces expériences, nous avons utilisé une trousse d'agonistes, produite par InvivoGen. Tous les TLRs visés par les agonistes de la trousse sont exprimés par les cellules RAW 264.7 (Schmitz *et al.*, 2004; Broad, Kirby et Jones 2007).

Les cellules ont été cultivées avec chaque agoniste à deux concentrations se situant à l'intérieur de la gamme recommandée par le distributeur. Le LPS et le Poly(I:C) ayant déjà été testés dans les expériences précédentes, seul le LPS à la concentration de 10 ng/ml a été inclu comme valeur de référence. Des cellules cultivées en présence de 100 U/ml d'IFN- γ ont également servi de témoin positif dans les trois expériences de stimulation par des agonistes de TLRs. En conformité avec les expériences précédentes, la moyenne d'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B dans les échantillons de cellules cultivées avec l'IFN- γ a été d'environ 20 x, soit 18,78 +/- 3,81 (résultats non illustrés).

En comparaison avec le LPS qui a induit l'expression du récepteur Ly49B au niveau attendu, la culture des cellules en présence d'agonistes des autres TLRs n'a pas permis d'identifier un autre récepteur dont l'engagement soit aussi efficace à cet effet (Fig. 9). En outre, aucun des agonistes testés n'a même augmenté l'expression du récepteur Ly49B à un niveau équivalent au niveau optimal induit par le Poly(I:C) (Voir Fig. 8). Néanmoins, s'il est clair que l'activation des cellules via TLR5 et TLR7

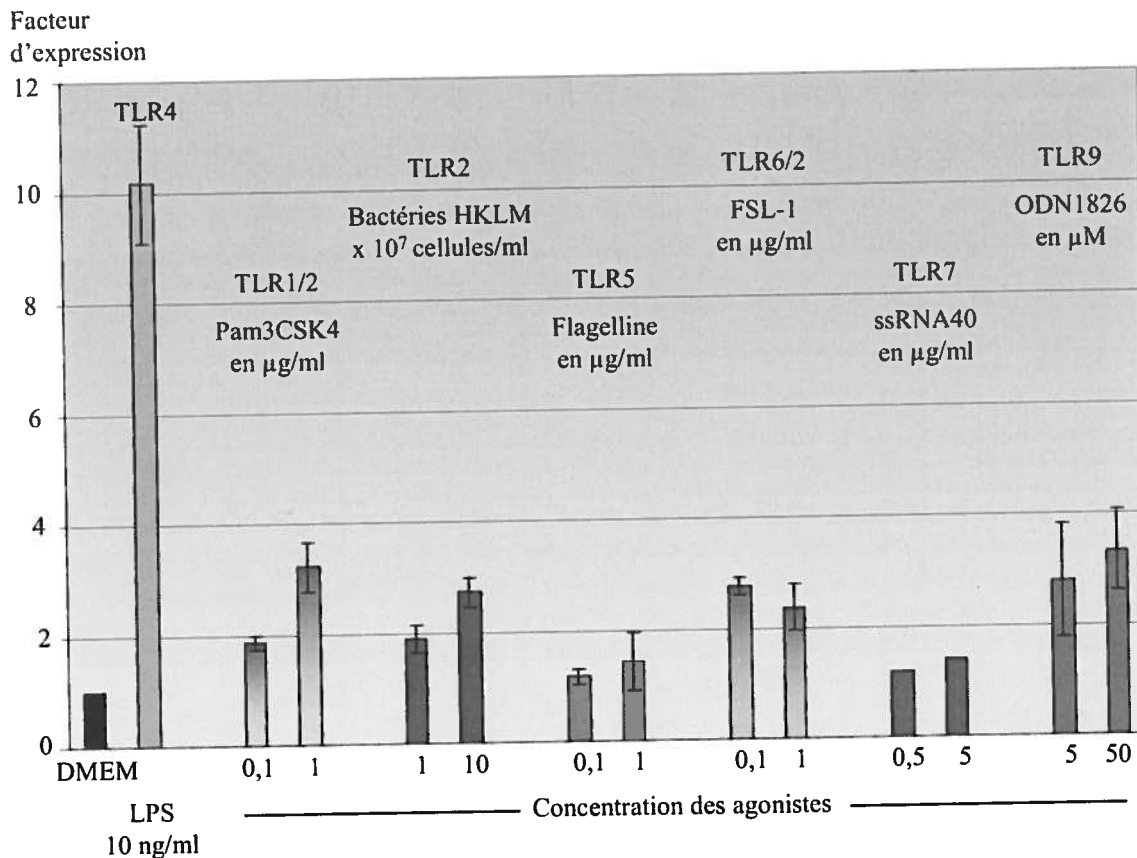


Figure 9: Modulation de l'expression du récepteur Ly49B par l'activation via différents TLRs

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différents agonistes des TLR selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faits de la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées correspondent à la moyenne de 3 expériences à l'exception de l'expérience avec l'agoniste des TLR7 qui n'a été effectuée qu'à deux reprises. Des échantillons témoins cultivés en présence d'IFN- γ (100 U/ml) ont été ajoutés dans chaque expérience. Le facteur moyen d'expression du récepteur Ly49B sur les cellules ainsi activées était de $18,78 \pm 3,81$.

n'influence aucunement l'expression de ce récepteur inhibiteur, l'engagement des récepteurs homodimériques ou hétérodimériques contenant TLR2 et des récepteurs TLR9 entraîne une augmentation d'expression de 2 à 3 fois le niveau basal. Cette modulation étant de faible amplitude comparativement à celles obtenues en présence d'IFN- γ ou de LPS, nous n'avons pas cru nécessaire de pousser plus loin cette analyse étant donné que les concentrations d'agonistes que nous avons retenues étaient conformes aux recommandations du distributeur.

De cette première partie de l'expérimentation, nous pouvons conclure que l'expression du récepteur Ly49B est augmentée à la surface de macrophages dans des conditions qui correspondent à celles d'une réponse immunitaire innée ou acquise. L'activation des macrophages, via les récepteurs de l'IFN- γ ou via certains TLRs, semble recruter le récepteur Ly49B dont l'expression est augmentée suite à l'engagement de ces récepteurs. Cependant, de l'ensemble des TLRs les récepteurs TLR4, exprimé en surface cellulaire, et TLR3, exprimé dans les endosomes, sont les seuls via lesquels nous avons pu démontrer un effet notoire (Fig. 7, 8 et 9). Un des points communs de ces deux récepteurs est que les signaux qu'engendre leur engagement peuvent emprunter la voie dépendante de TRIF qui mène à l'activation de IRF3, un facteur de transcription qui joue un rôle déterminant dans l'induction de l'interféron de type I, plus particulièrement de l'IFN- β (voir la section 3.3.1 de la revue bibliographique). Nous avons donc posé l'hypothèse que l'IFN- β était peut-être le facteur intermédiaire responsable de la modulation de l'expression du récepteur Ly49B suite à l'engagement de TLR3 ou TLR4.

1.3 - Rôle de l'IFN- β dans la modulation de l'expression du récepteur Ly49B

Nous avons utilisé deux approches pour évaluer cette hypothèse. Comme nous l'avons fait pour l'IFN- γ (voir Fig. 6), nous avons d'abord mesuré directement la modulation de l'expression du récepteur Ly49B dans des cultures cellulaires contenant des quantités variables d'IFN- β . Nous avons ensuite évalué l'effet de la présence d'anticorps neutralisants anti-IFN- β dans des cultures cellulaires stimulées par des agonistes de TLR3 et TLR4.

1.3.1 - Effet direct de l'IFN- β sur la modulation du niveau d'expression du récepteur Ly49B

Tel qu'illustré dans la figure 10, l'incubation des cellules en présence d'IFN- β induit effectivement une augmentation de l'expression du récepteur Ly49B. Comme pour les trois agonistes testés précédemment, nous avons identifié une gamme de concentrations auxquelles l'effet observé est dépendant de la dose et nous avons également noté une zone plateau qui s'amorce à la concentration de 200 U/ml.

1.3.2 - Contribution de l'IFN- β autocrine à la modulation de l'expression du récepteur Ly49B induite lors de l'engagement de TLR4 et de TLR3

L'activation des macrophages via certains TLRs, notamment TLR3 et TLR4, induit la production d'IFN- β qui peut alors agir en circuit autocrine puisque les macrophages ont les récepteurs appropriés (Jacobs et Ignarro 2001; Broad, Kirby et Jones 2007). Il est donc possible que l'IFN- β soit responsable en totalité ou en partie de l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B observée lorsque les cellules sont cultivées en présence de LPS ou de Poly(I:C).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons cultivé les cellules en présence de concentrations sub-optimales de LPS (0,5 ng/ml) ou de Poly(I:C) (6 μ g/ml) et nous avons ajouté au milieu de culture des quantités variables d'anticorps polyclonaux de chèvre dirigés contre l'IFN- β . Des cultures contenant uniquement des quantités variables d'agonistes de TLR3 ou TLR4 servent de valeurs de référence pour estimer l'efficacité de la suppression en présence des anticorps neutralisants anti-IFN- β . D'autre part, l'ajout d'anticorps anti-IFN- β à des cultures stimulées avec 100 U/ml d'IFN- β permet de contrôler l'efficacité du réactif. Enfin, des cultures contenant uniquement des anticorps anti-IFN- β , ont aussi été incluses afin de nous assurer que ce réactif n'affectait pas, par

Facteur
d'expression

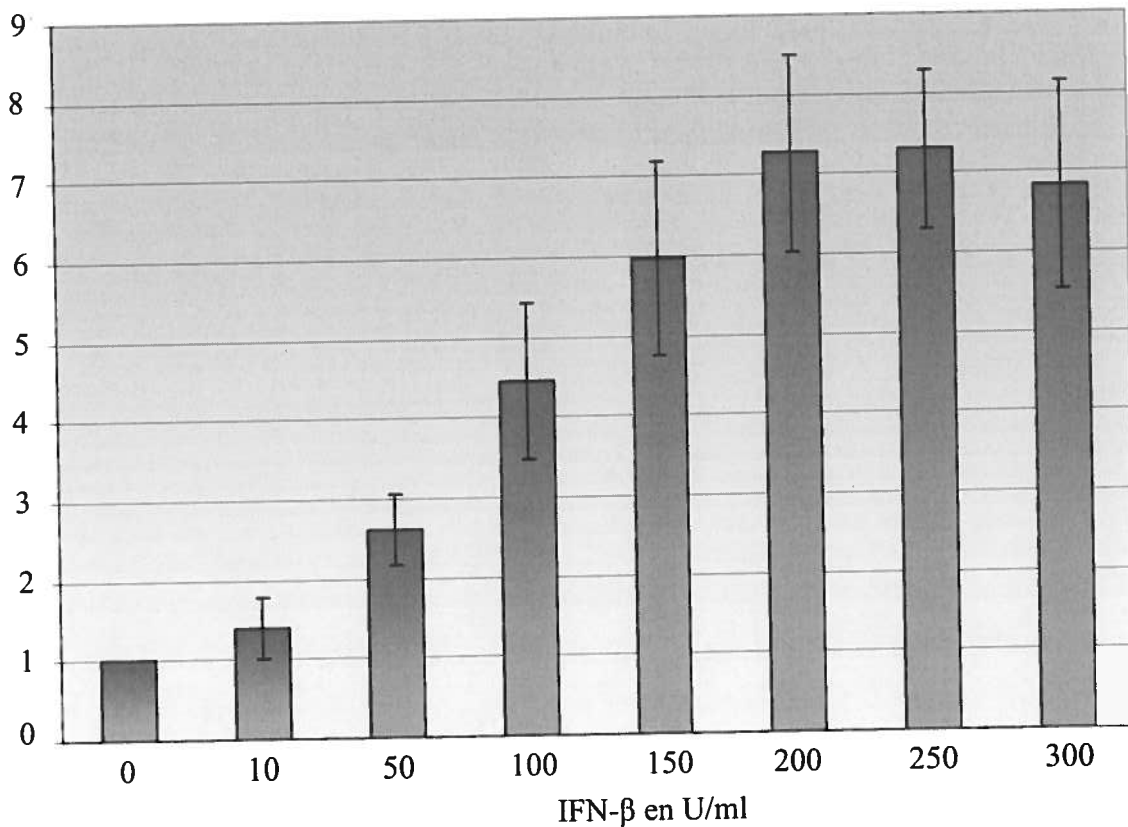


Figure 10: Modulation de l'expression du récepteur Ly49B par l'IFN- β

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différentes concentrations d'IFN- β selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faits de la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées correspondent à la moyenne de 2 à 4 expériences. Des échantillons témoins cultivés en présence d'IFN- γ (100 U/ml) ont été testés. Le facteur moyen d'expression du récepteur Ly49B sur les cellules ainsi activées était de 20,74 \pm 4,18.

lui-même, l'expression du récepteur Ly49B. Des cultures contenant uniquement 100 U/ml d'IFN- γ ont été suivies en parallèle afin de vérifier la réactivité des cellules en conditions optimales de stimulation. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 11 et 12.

Dans le cas d'une activation via TLR4 par l'intermédiaire du LPS, on constate qu'il est possible de bloquer complètement l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B à condition cependant que les anticorps anti-IFN- β soient en excès (Fig. 11). Alors que la modulation induite par l'INF- β est complètement inhibée en présence de 200 UN/ml d'anticorps, il faut, en effet, ajouter quatre fois plus de réactif pour réduire de manière comparable une réponse de même niveau induite par le LPS. Le blocage de la modulation de l'expression du récepteur Ly49B est cependant dépendant de la quantité d'anticorps ajoutée. En référence à la gamme dose-réponse établie en même temps avec les cultures ne contenant que du LPS, la suppression obtenue avec 200 UN/ml d'anticorps serait à peu près de 50%. Ces observations confirment que l'IFN- β sécrété par les macrophages stimulés par le LPS et utilisé de manière autocrine contribue à la modulation de l'expression du récepteur Ly49B et suggère, que dans les conditions d'activation utilisées, il puisse même en être le seul responsable. Dans l'expérience présentée ici, le niveau basal d'expression du récepteur Ly49B était un peu plus élevé que normalement, ce qui a eu pour conséquence de diminuer les facteurs d'expression de tous les échantillons. Bien que les données soient plus faibles comparées aux gammes illustrées dans les figures précédentes, ces résultats démontrent clairement la contribution de l'IFN- β à la modulation de l'expression du récepteur Ly49B à la surface de cellules activées via TLR4.

Le rôle que pourrait jouer l'IFN- β dans la modulation du récepteur Ly49B à la surface de cellules stimulées par le Poly(I:C) via TLR3 est moins clair. L'effet observé antérieurement dans les cultures stimulées par le Poly(I:C) ayant été de faible amplitude (Fig. 8), nous avons effectué la gamme témoin avec de plus grandes dilutions à partir de la valeur de référence utilisée dans les cultures contenant les anticorps anti-IFN- β espérant ainsi mieux visualiser l'effet recherché. L'ajout dans le milieu de culture de 200 UN/ml d'anticorps anti-IFN- β réduit l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B, mais contrairement à ce qui avait été observé pour les cellules stimulées avec le LPS, nous n'avons pas noté d'effet plus prononcé en ajoutant de plus fortes doses d'anticorps (Fig. 12). En référence à la gamme témoin, puisque le niveau d'expression du récepteur Ly49B

Facteur
d'expression

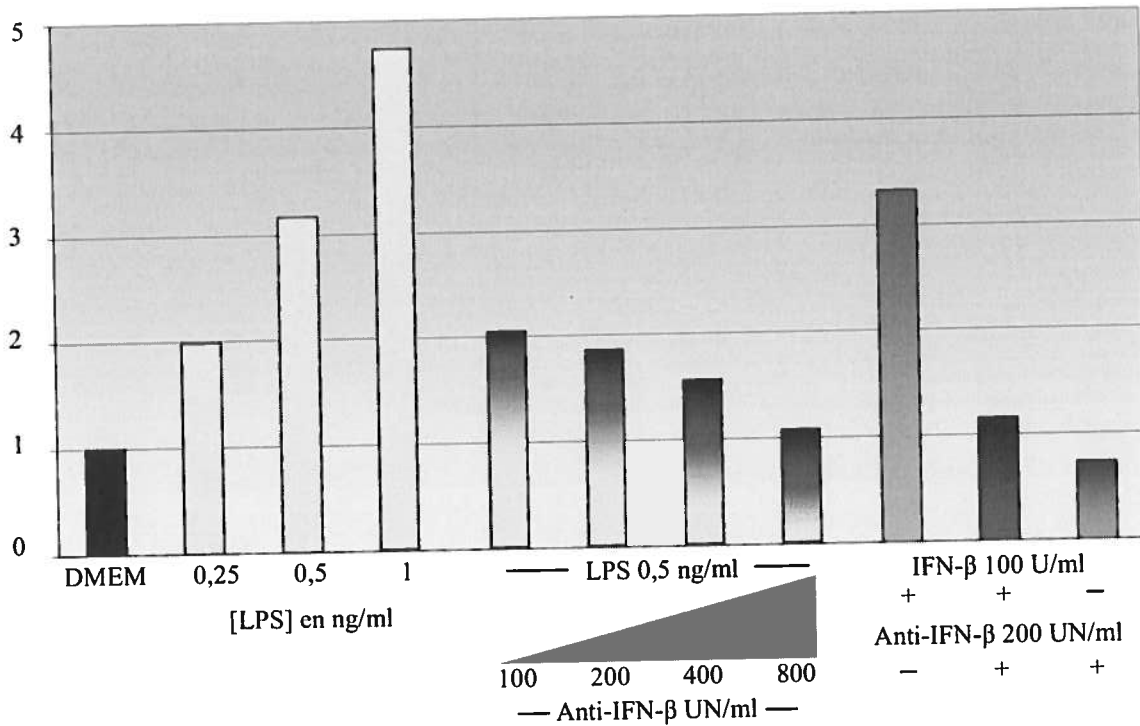


Figure 11: Contribution de l'IFN-β autocrine à la modulation de l'expression du récepteur Ly49B par le LPS

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différentes concentrations de LPS et/ou d'IFN-β selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faites à la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées sont représentatives de 3 expériences ayant donné des résultats similaires. Des échantillons témoins cultivés en présence d'IFN-γ (100 U/ml) ont été ajoutés dans chaque expérience. Le facteur moyen d'expression du récepteur Ly49B sur les cellules ainsi activées était de 20,67 +/- 4,72.

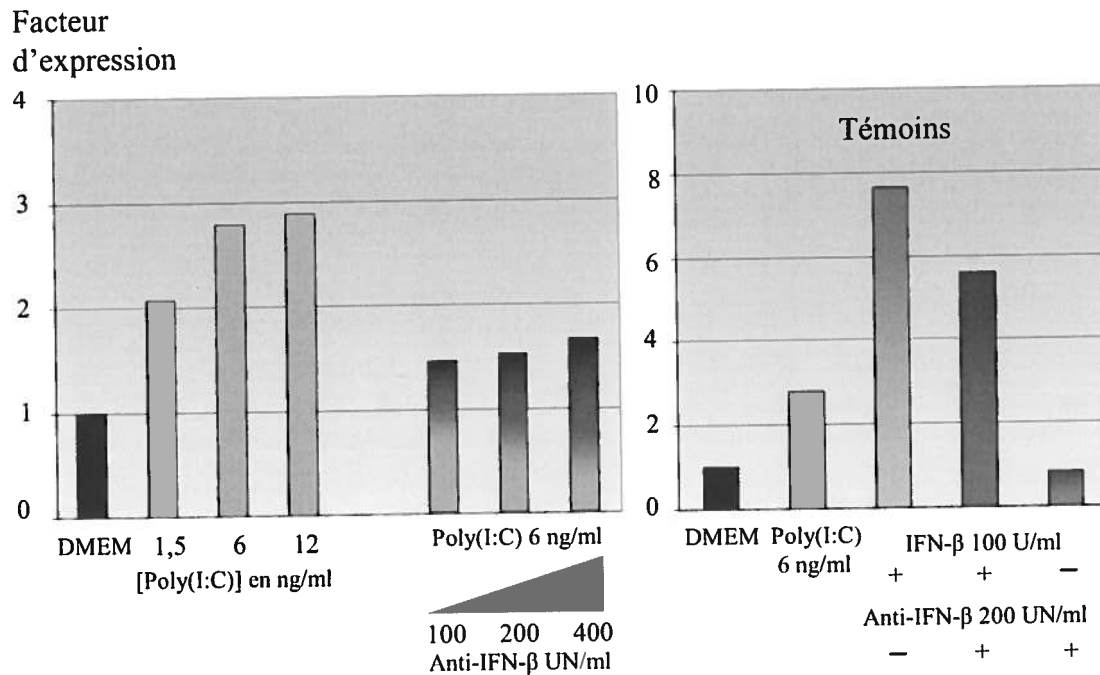


Figure 12: Contribution de l'IFN-β autocrine à la modulation de l'expression du récepteur Ly49B par le Poly(I:C)

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différentes concentrations de Poly(I:C) et/ou d'IFN-β selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faits de la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées sont représentatives de 3 expériences ayant donné des résultats similaires. Des échantillons témoins cultivés en présence d'IFN-γ (100 U/ml) ont été ajoutés dans chaque expérience. Le facteur moyen d'expression du récepteur Ly49B sur les cellules ainsi activées était de 17,70 +/- 3,62.

dans les cultures contenant des anticorps anti-IFN- β est inférieur à celui atteint avec une concentration quatre fois moindre d'agoniste, on estime à plus de 75% l'inhibition de l'effet du Poly(I:C) et ce, dans toutes les conditions testées. Dans l'expérience présentée, le niveau d'expression du récepteur Ly49B induit par 100 U/ml d'IFN- β était plus élevé qu'à la normale. Son effet est plus difficile à bloquer mais la diminution du niveau d'expression du récepteur Ly49B observé confirme l'efficacité des anticorps anti-IFN- β dans cette expérience. Puisque dans les cultures avec le Poly(I:C) l'inhibition n'est pas plus marquée lorsque le milieu de culture contient deux ou trois fois plus d'anticorps neutralisants anti-IFN- β , nous concluons que l'IFN- β autocrine produit en réponse à une stimulation via TLR3 ne semble pas être le seul facteur en cause dans l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B induite par cette voie d'activation. Cette expérience a été reprise deux fois et à chaque fois nous avons observé une diminution du niveau d'expression du récepteur Ly49B sans jamais obtenir une inhibition totale. Cependant, la faible efficacité du Poly(I:C) dans la modulation de l'expression du récepteur qui nous intéresse ne permet pas d'apprécier très précisément la contribution de l'IFN- β autocrine à l'effet observé.

1.4 - Implication du TNF- α dans la modulation du niveau d'expression du récepteur Ly49B

Dans la section précédente, nous avons démontré que l'activation des cellules RAW 264.7 via TLR4, TLR3 et à un degré moindre, via TLR9 et via les récepteurs homodimériques ou hétérodimériques contenant TLR2, induisait une augmentation de l'expression du récepteur Ly49B. L'IFN- β pourrait être l'intermédiaire actif dans la plupart des cas, mais pas suite à l'activation via TLR2 qui n'induit pas de production d'interféron de type I (revue par Akira, Uematsu et Takeuchi 2006). De plus, la modulation de l'expression du récepteur Ly49B suite à l'activation via TLR3 n'a pu être inhibée complètement en présence d'anticorps anti-IFN- β (voir Fig.12). Puisque l'activation via les TLRs se traduit par la production de tout un ensemble de cytokines inflammatoires, une d'entre elles pourrait peut-être jouer un rôle semblable à celui de l'IFN- β dans la modulation de l'expression du récepteur Ly49B. Le TNF- α nous a semblé un bon candidat à ce titre. Les cellules RAW 264.7 expriment constitutivement des récepteurs de TNF- α à

leur surface (Ding *et al.*, 1989) et elles produisent du TNF- α notamment en réponse au LPS (Beutler *et al.*, 1985) et à l'IFN- γ (Wynn, Freund et Paulnock 1992) que nous avons identifiés comme les meilleurs inducteurs de l'expression du récepteur Ly49B (voir Fig. 6 et 7). Comme l'IFN- β , le TNF- α peut agir en circuit autocrine sur le macrophage. De concert avec NF- κ B, il est notamment impliqué dans la régulation transcriptionnelle de la cyclooxygénase (COX)-2 (Vila-del Sol et Fresno 2005) et également dans la régulation de la synthèse de iNOS dans les cellules RAW 264.7 stimulées par l'IFN- γ (Ding *et al.*, 1989). Par ailleurs, des auteurs ont conclu à partir d'expériences faites avec cette même lignée cellulaire que le TNF- α contribuait de manière autocrine à la baisse de l'expression des molécules de classe II du CMH induite par l'IFN- γ (Wynn, Freund et Paulnock 1992). L'effet variable du TNF- α autocrine sur différentes propriétés des cellules RAW 264.7 activées nous a donc incités à tester son rôle éventuel dans la modulation de l'expression du récepteur Ly49B.

Nous avons d'abord cultivé les cellules en présence de concentrations croissantes de TNF- α . Nous avons également mis des cellules RAW 264.7 en culture en présence d'une quantité constante sub-optimale d'IFN- γ et de quantités croissantes de TNF- α de façon à reproduire des conditions d'activation de type classique. La concentration de 10 U/ml d'IFN- γ utilisée pour ces expériences se situe à mi-niveau de la gamme dans laquelle l'effet sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B est dépendant de la dose (voir Fig. 6). Dans ces conditions, même une faible variation du niveau d'expression du récepteur Ly49B devrait être facilement perceptible. Comme dans les expériences précédentes, des cellules cultivées en présence de 10 ou 100 U/ml d'IFN- γ seulement ont servi de témoins.

Alors qu'une concentration optimale d'IFN- γ induit la modulation de l'expression du récepteur Ly49B au niveau attendu (20 x), le TNF- α , à titre de seule cytokine présente dans le milieu de culture, n'a eu aucun effet à aucune des concentrations testées (Fig. 13). Cependant, à la plus forte concentration utilisée, le TNF- α a réduit l'effet induit par une dose sub-optimale d'IFN- γ . En référence à la courbe dose-réponse de la figure 6, l'inhibition observée serait de l'ordre d'environ 50%. Ainsi, alors que le TNF- α agit généralement comme facteur amplificateur dans l'activation classique du macrophage, cette cytokine aurait plutôt un effet antagoniste sur l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B induite par l'IFN- γ .

Facteur
d'expression

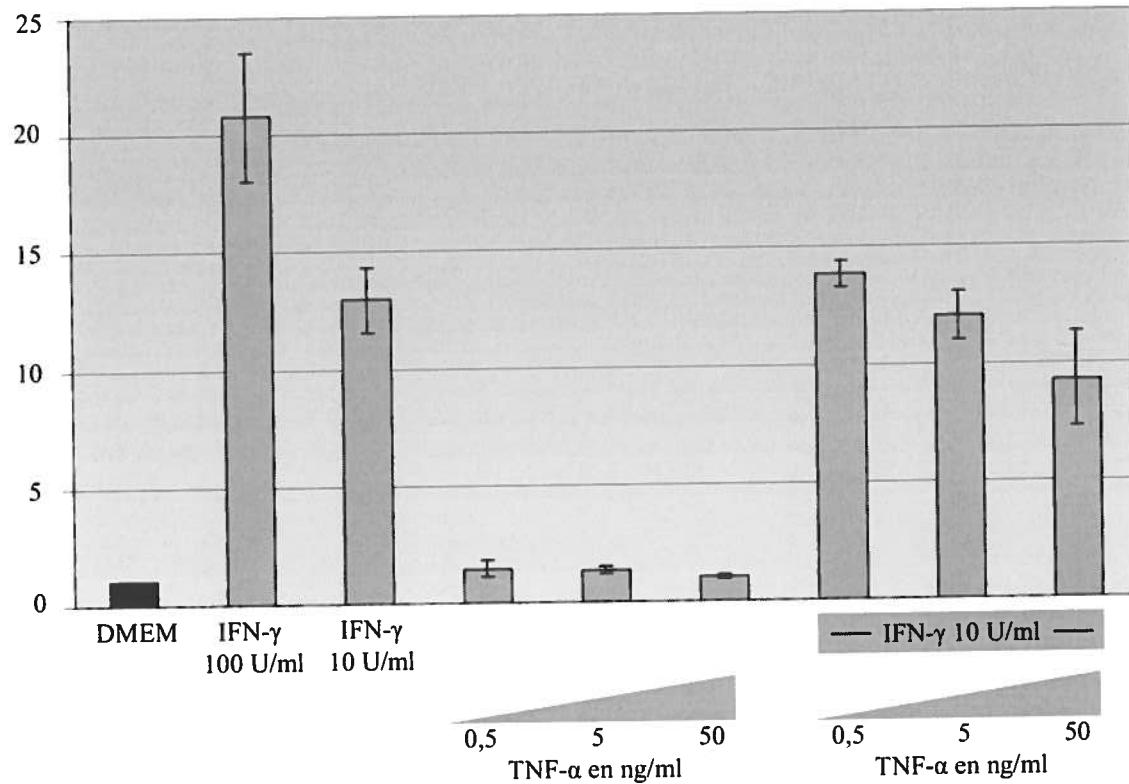


Figure 13: Modulation de l'expression du récepteur Ly49B en présence de TNF- α et/ou d'IFN- γ

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différentes concentrations de TNF- α et/ou d'IFN- γ selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faits de la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées correspondent à la moyenne de 3 expériences.

1.5 - Effet synergique de l'IFN- γ et du LPS sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B

Plusieurs articles ont rapporté que l'ajout simultané ou décalé d'IFN- γ et de LPS dans le milieu de culture des macrophages permettait d'amplifier par effet synergique la réponse de ces cellules. L'expression de nombreux gènes et la production de NO sont ainsi modulées à la hausse dans les cellules RAW 264.7 mises en présence de ces deux agonistes combinés (Le Page *et al.*, 1996; Held *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2006). Nous avons cherché à savoir si de telles conditions produisaient un effet analogue sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B. Des cellules RAW 264.7 ont été mises en culture durant 16 à 18 h en présence de LPS (0,5 ng/ml) et/ou d'IFN- γ (6,25 U/ml) ajoutés simultanément ou l'un après l'autre à un intervalle de 1 h. Nous avons choisi ces concentrations car nous savons de nos expériences précédentes qu'elles sont suffisantes pour induire une augmentation du niveau d'expression du récepteur Ly49B, mais que l'addition des facteurs d'expression obtenus avec chacune n'atteint pas le niveau observé avec la concentration optimale de l'agoniste le plus efficace. Ces conditions sont donc adéquates pour déterminer si l'effet synergique observé avec ces deux inducteurs, par rapport à d'autres propriétés des macrophages, se manifesterait également pour la modulation de l'expression du récepteur Ly49B en surface cellulaire. Les données présentées dans la figure 14 correspondent à la moyenne de 3 expériences.

L'ajout d'IFN- γ et de LPS simultanément ou de LPS puis d'IFN- γ après une heure a un effet cumulatif sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B. Par ailleurs, l'incubation des cellules, pendant une heure avec l'IFN- γ seul avant d'ajouter le LPS, permet d'atteindre un facteur moyen d'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B dépassant de 4 l'effet cumulatif de ces deux agonistes. Ces résultats suggèrent donc qu'à l'instar d'autres propriétés du macrophage, la modulation de ce récepteur inhibiteur puisse survenir en réponse à l'action synergique de l'IFN- γ et du LPS. Cependant, pour pouvoir transformer cette hypothèse en conclusion ferme, il serait nécessaire, soit de reproduire ces résultats dans un plus grand nombre d'expériences pour réduire les écarts types, soit de modifier les conditions expérimentales (diminution de la concentration des agonistes, accroissement de la durée de l'intervalle avant l'addition du LPS) de manière à augmenter la différence par rapport à l'effet cumulatif des deux agonistes.

Facteur
d'expression

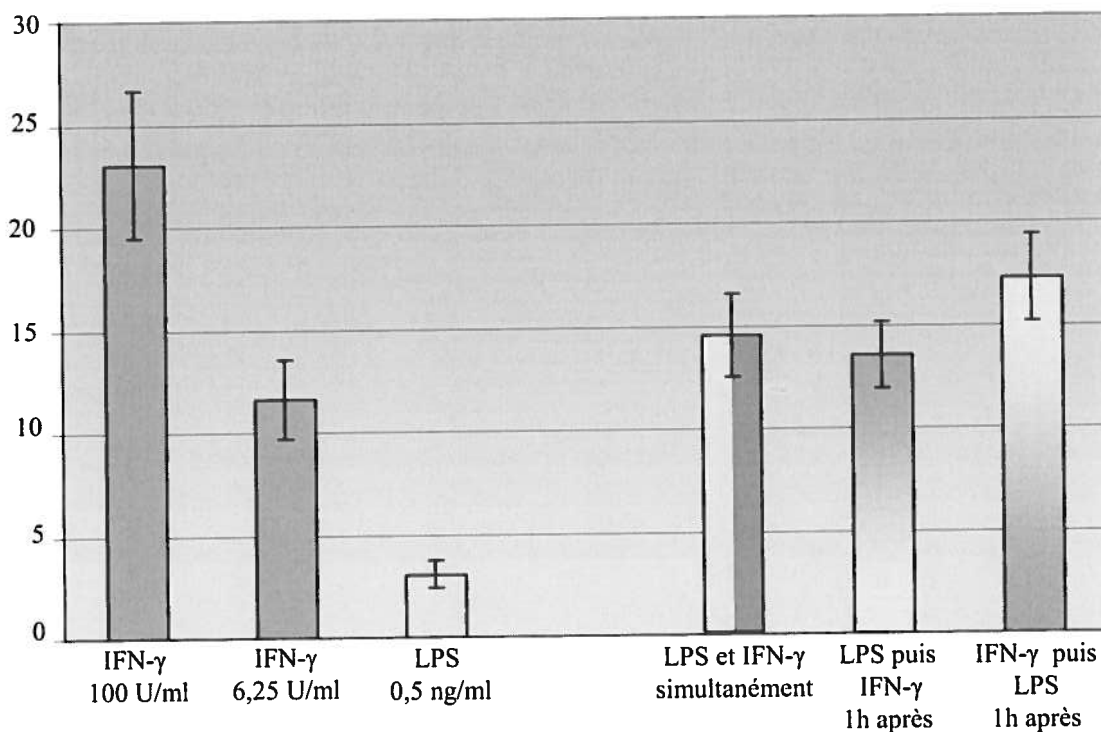


Figure 14: Effet de la stimulation combinée par le LPS et l'IFN- γ sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de 6,25 U/ml d'IFN- γ et/ou de LPS 0,5 ng/ml ajoutés simultanément ou avec 1 h d'intervalle selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faits de la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées correspondent à la moyenne de 3 expériences.

1.6 - Modulation de l'expression du récepteur Ly49B dans le cas d'une activation alternative par l'IL-4

L'expression de plusieurs récepteurs fonctionnels, impliqués notamment dans la présentation d'antigène, la phagocytose et l'endocytose, est modulée à la hausse suite à l'activation des macrophages par la voie d'activation dite alternative (revue par Goerdts et Orfanos 1999; Gordon 2003; Mosser 2003). En général, le répertoire moléculaire des voies d'activation classique et alternative varie de manière opposée, c'est-à-dire que les molécules dont l'expression est augmentée suite à l'activation par la voie classique (par exemple par l'IFN- γ ou par des agonistes de TLR) verront leur expression inhibée lors de l'activation alternative (par exemple par l'IL-4) (Goerdts et Orfanos 1999).

Ce n'est cependant pas toujours le cas. Par exemple, il a été rapporté récemment que l'expression de certains des récepteurs Scavenger (SR), généralement augmentée suite à l'activation par l'IL-4 (Mosser 2003; Jozefowski *et al.*, 2005), le serait aussi, de manière synergique, lors de l'activation de cellules RAW 264.7 par des agonistes de TLR2 et TLR4 (Xu *et al.*, 2007). Nous avons décidé d'évaluer si la modulation de l'expression du récepteur Ly49B pouvait être induite par l'activation alternative par l'IL-4 et de mesurer parallèlement si cette dernière ne pourrait pas plutôt contrer l'effet de l'IFN- γ . En nous basant sur des doses utilisées dans des conditions d'expériences similaires, nous avons mesuré l'expression du récepteur Ly49B en présence de concentrations variables d'IL-4 dans le milieu de culture allant de 5 à 20 ng/ml (Dello Sbarba *et al.*, 1996; Palmqvist *et al.*, 2006).

Tel qu'illustré dans la figure 15, la présence d'IL-4 seule dans le milieu de culture ne modifie pas l'expression du récepteur Ly49B qui demeure au niveau basal. En utilisant le même protocole que celui utilisé lors des expériences avec le TNF- α , nous avons mesuré l'effet de l'addition simultanée d'IL-4 et d'IFN- γ dans le milieu de culture.

Selon les résultats obtenus en présence des deux cytokines, l'IL-4 atténuerait légèrement l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B induite par l'IFN- γ mais de façon mineure par rapport à l'effet observé avec le TNF- α (voir Fig. 13).

Facteur
d'expression

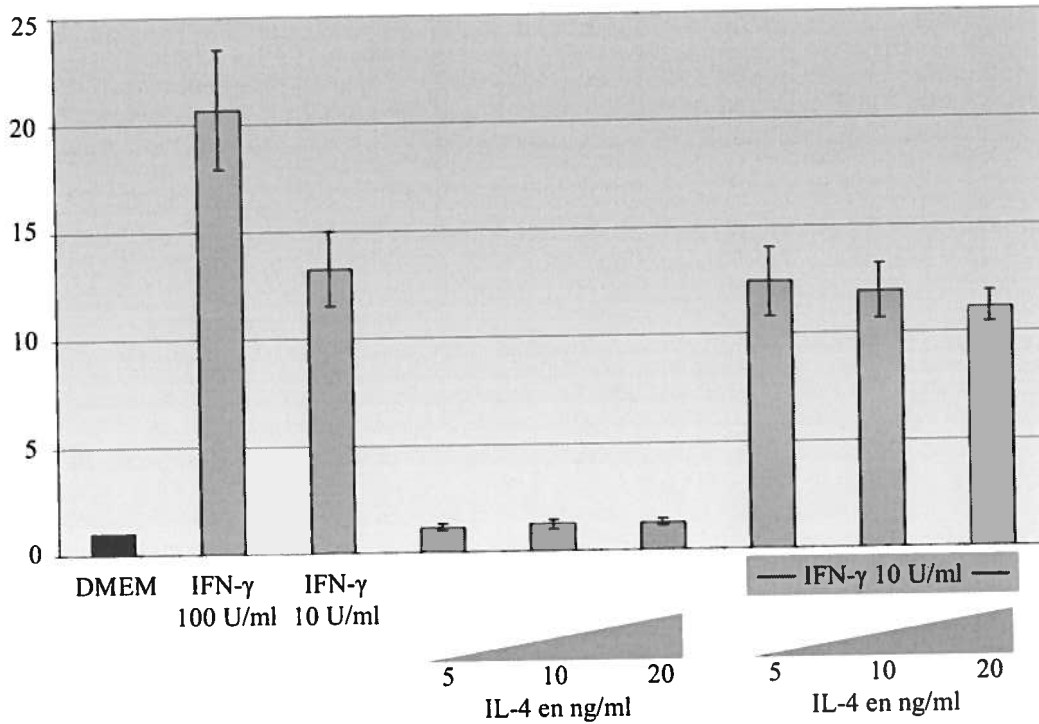


Figure 15: Modulation de l'expression du récepteur Ly49B en présence d'IL-4 et/ou d'IFN- γ

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différentes concentrations d'IFN- γ et/ou d'IL-4 selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faits de la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées correspondent à la moyenne de 3 expériences.

1.7 - Modulation de l'expression du récepteur Ly49B par l'IL-10

Tel que mentionné dans la revue bibliographique (section 3.3.4.3), les macrophages activés par la voie classique peuvent être désactivés par certaines cytokines dont l'IL-10. Cette cytokine, surtout produite par des macrophages activés par la voie alternative (Goerdt et Orfanos 1999; Gordon 2003; Mosser 2003), peut également être synthétisée en réponse à des agonistes de TLRs, notamment TLR3, TLR4 et TLR9. Les signaux impliqués peuvent être dépendants de la voie MyD88, de la voie TRIF ou des deux selon les TLRs concernés (Boonstra *et al.*, 2006). L'ajout d'IL-10 dans le milieu de culture de cellules RAW 264.7 pré-stimulées avec du LPS inhibe notamment la fixation du facteur de transcription NF- κ B à l'ADN et ainsi réprime la transcription de nombreux gènes (Clarke *et al.*, 1998). Pour évaluer si l'IL-10 pouvait affecter l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B induite par l'IFN- γ , nous avons de nouveau utilisé le même protocole que pour le TNF- α . Les cellules RAW 264.7 expriment constitutivement des récepteurs d'IL-10 (Weber-Nordt, Meraz et Schreiber 1994; Mohamed *et al.*, 2007) et la capacité de l'IL-10 à empêcher ces cellules de produire par exemple de l'IL-12 a été observée avec des concentrations du même ordre que celles que nous avons utilisées dans nos expériences (Rahim *et al.*, 2005). Les résultats présentés dans la figure 16 démontrent d'abord que dans les conditions utilisées, l'IL-10 affecte à peine l'expression du récepteur Ly49B lorsque le milieu de culture ne contient aucun autre inducteur. En revanche, la présence de l'IL-10 à des concentrations de 5 et 50 ng/ml dans les cultures contenant 10 U/ml d'IFN- γ accroît à 20 x le facteur d'expression du récepteur Ly49B, soit un niveau équivalent à celui atteint lorsque les cellules sont cultivées avec une concentration 10 fois plus grande d'IFN- γ . L'effet synergique observé ici est même supérieur à celui noté dans les cultures contenant de l'IFN- γ et du LPS ajoutés au milieu de culture à une heure d'intervalle (voir Fig.14).

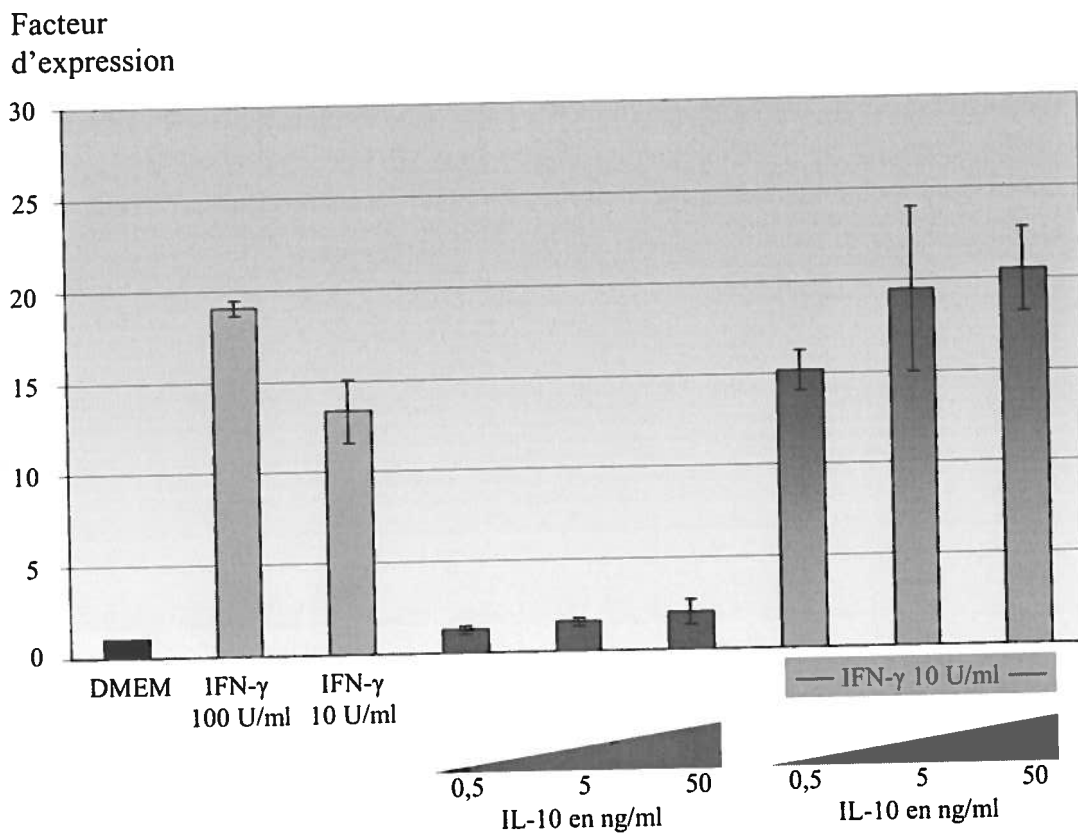


Figure 16: Modulation de l'expression du récepteur Ly49B en présence d'IL-10 et/ou d'IFN- γ

Des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence de différentes concentrations d'IL-10 et/ou d'IFN- γ selon les conditions décrites dans la section méthodologie. Le marquage des cellules et le calcul des données ont été faits de la manière décrite dans la légende de la figure 6. Les valeurs illustrées correspondent à la moyenne de 3 expériences.

2 - Effet de l'engagement du récepteur Ly49B par des anticorps immobilisés

Les expériences présentées jusqu'ici nous ont permis de mettre en évidence la modulation de l'expression du récepteur Ly49B dans différentes conditions d'activation des cellules RAW 264.7 et d'identifier le rôle intermédiaire, synergique ou antagoniste de certains médiateurs. Un autre étudiant de notre laboratoire avait préalablement démontré la capacité du récepteur Ly49B à recruter la phosphatase SHP-1 (Perrée 2003), confirmant ainsi son potentiel inhibiteur suggéré par la présence d'un motif ITIM dans sa portion cytoplasmique (Wong *et al*, 1991). Le caractère inductible de ce récepteur et sa capacité à fixer la première protéine d'une cascade typique de l'engagement des récepteurs Ly49 inhibiteurs, suggéraient que l'expression du récepteur Ly49B soit amplifiée à la surface des macrophages dans certaines conditions d'activation pour y participer à la régulation d'une ou de plusieurs des fonctions acquises par les cellules activées. Malheureusement, les tentatives réalisées alors pour identifier les fonctions du macrophage qui pourraient être régulées par le récepteur Ly49B ont été infructueuses (Perrée, 2003). L'analyse rétrospective de ces expériences, à la lumière des résultats rapportés dans le présent mémoire, nous a permis d'identifier des causes potentielles de l'inefficacité des protocoles utilisés alors pour les tests fonctionnels : les doses des agonistes ajoutés au milieu pour activer les cellules étaient vraisemblablement trop élevées (zone plateau) et l'addition des anticorps anti-Ly49B pour bloquer la fonction évaluée n'aurait été faite ni au bon moment ni dans des conditions optimales. Nous avons donc décidé de reconsidérer la question dans un contexte mieux contrôlé.

2.1 - Effet du co-engagement du récepteur Ly49B sur la production de NO par des cellules RAW 264.7 activées via CD40

Des études avec les cellules NK ont permis d'établir que deux conditions sont nécessaires pour que les signaux des récepteurs Ly49 inhibiteurs soient perceptibles: 1) l'engagement des récepteurs inhibiteurs doit s'effectuer en même temps ou peu de temps avant l'engagement des récepteurs activateurs (Kim et Yokoyama 1998) et 2) le signal inhibiteur doit avoir une intensité suffisante pour pouvoir bloquer le signal activateur (Vivier, Nunes et Vely 2004; Malarkannan 2006). Pour les récepteurs qui ont plusieurs ligands, le niveau d'expression nécessaire pour qu'un récepteur inhibiteur engendre un signal dépendra de son affinité pour le ligand auquel il se lie (Chalifour *et al*, 2003). Dans une expérimentation dont le but est de mesurer l'effet de l'engagement d'un récepteur inhibiteur par des anticorps immobilisés, il est primordial de bien choisir le récepteur via lequel sera généré le signal activateur qu'on souhaite contrer. Les conditions de stimulation doivent aussi être établies très soigneusement pour s'assurer que les résultats seront interprétables.

Puisque le récepteur Ly49B est un récepteur orphelin, il n'y avait guère d'autre choix, pour identifier la ou les fonctions qu'il pourrait éventuellement réguler, que d'évaluer les conséquences de son engagement par des anticorps immobilisés. Le fait qu'il soit faiblement exprimé à la surface des cellules non activées, constituait la première embûche car il est probable que son engagement par un anticorps agoniste ne générerait pas de signal perceptible. Il fallait donc d'abord établir des conditions qui permettent d'accroître son expression à la surface des macrophages et identifier ensuite une fonction qui puisse être augmentée par l'engagement d'un récepteur activateur, idéalement de la même manière, soit par des anticorps immobilisés.

La production de NO induite via CD40 répond à ces exigences. L'importance de l'engagement du récepteur CD40 dans l'induction de cette fonction a été démontrée en comparant l'efficacité de lymphocytes T allogéniques de souris normales ou déficientes en CD40L (CD40L^{-/-}) à induire la production de NO par des macrophages spléniques de

souris DBA/2, co-cultivés avec les lymphocytes T (Stout *et al.*, 1996). Un effet semblable a été obtenu en engageant, à l'aide d'anticorps immobilisés, des molécules CD40 exprimées à la surface des cellules péritonéales résidentes de souris B6, cultivées 18 h en présence d'IFN- γ (Nashleanas et Scott 2000). Des résultats similaires ont aussi été obtenus avec des cellules microgliales de souris, cultivées en présence de 25 U/mL d'IFN- γ , l'anticorps n'ayant par ailleurs aucun effet sur les cellules non-activées (Jana *et al.*, 2001). Enfin, l'induction de la production de NO a aussi été observée avec des macrophages dérivés de la moelle osseuse, incubés en présence d'anticorps anti-CD40 (Andrade *et al.*, 2005). Les macrophages non activés n'expriment pas CD40, mais cette molécule apparaît, en surface cellulaire, après stimulation avec différentes doses de LPS (Saxena, Vallyathan et Lewis 2003).

La protéine CD40 ne possède pas de domaine ITAM, mais a la possibilité d'activer un grand nombre de seconds messagers et d'induire notamment l'activation de nombreuses tyrosines kinases dont Lyn, Syk et Jak3, la PI₃ Kinase et la phospholipase C γ 2. La cascade signalétique résultant de l'activation de CD40 se poursuit avec le recrutement de protéines de type TRAF. Il s'agit de TRAF2, TRAF6 et TRAF3 (qui active TRAF5). L'activation de ces protéines de signalisation va permettre l'activation de nombreux facteurs de transcription dont ERK, JNK, p38 et NF κ B (van Kooten et Banchereau 2000). La fixation de NF κ B sur le promoteur du gène qui code pour l'enzyme iNOS (inductible NO synthase) va induire la synthèse de iNOS et augmenter la production de NO. Dans le macrophage, ce processus est amplifié lorsque de l'IFN- γ est présent dans le milieu.

Finalement, une étude récente a démontré que la tyrosine phosphatase SHP-1 est capable d'induire une inhibition de la production de NO induite par le LPS sur des cellules RAW-TT10 qui surexpriment la protéine SHP-1 (Hardin *et al.*, 2006). Celle-ci étant impliquée dans la voie de signalisation du récepteur Ly49B (voir section 4 de la revue bibliographique), il est donc possible que ce récepteur puisse induire une inhibition de la production de NO une fois engagé.

Pour évaluer le rôle fonctionnel du récepteur Ly49B, nous avons développé un protocole afin d'augmenter, à l'aide d'anticorps anti-CD40 immobilisés, la production de NO par les cellules RAW 264.7 cultivées préalablement avec de l'IFN- γ . Nous avons ensuite mesuré l'effet de l'engagement simultané du récepteur Ly49B par l'anticorps 3LP218. Un anticorps monoclonal de rat de même isotype (IgG2b), spécifique de Ly49G2, un récepteur non exprimé sur les macrophages, a servi de témoin négatif. Pour assurer la bonne orientation des anticorps utilisés, ceux-ci ont été immobilisés dans des puits de culture préalablement tapissés avec des fragments F(ab')₂ d'IgG de chèvre spécifiques du fragment Fc des IgG de rat. Les anticorps non fixés au fond des puits ont été éliminés par lavage avant l'addition des cellules préalablement stimulées ou non avec de l'IFN- γ (voir protocole détaillé dans la section 5.1 de Matériel et méthodes).

Dans une expérience préliminaire, nous nous sommes d'abord assurés de l'expression du CD40 à la surface des cellules RAW 264.7 cultivées en présence d'IFN- γ et nous avons par la même occasion confirmé que l'anticorps 1C10 que nous voulions utiliser comme agoniste s'y liait correctement. (Résultats non illustrés). L'étape suivante a été de déterminer quelle serait la meilleure dose d'IFN- γ à utiliser pour activer les cellules RAW 264.7. Pour la sensibilité du test, celle-ci devait absolument se situer à l'intérieur de la zone dans laquelle l'effet sur l'augmentation du niveau d'expression du récepteur Ly49B est dépendant de la dose (voir Fig. 6). D'autre part, le niveau d'expression de CD40 devait être suffisant pour que son engagement par des anticorps immobilisés augmente la production de NO.

Les résultats, présentés dans la figure 17A démontrent d'abord que la production de NO par les cellules activées augmente avec la dose d'IFN- γ . Il est à noter toutefois que la production basale de NO est plus élevée pour les cellules RAW 264.7 que pour des macrophages de la cavité péritonéale (Nashleanas et Scott 2000), les cellules RAW 264.7 ne semblant pas avoir besoin d'un premier signal d'activation pour produire du NO (Matsuura et al., 2003). L'incubation ultérieure des cellules activées dans des puits tapissés d'anticorps anti-CD40 augmente faiblement la réponse mais les IgG témoin n'ont aucun effet par rapport à la production de NO par les cellules incubées dans des puits ne contenant que les F(ab')₂. Les différences les plus marquées attribuables à l'engagement de CD40 ont été observées avec les cellules

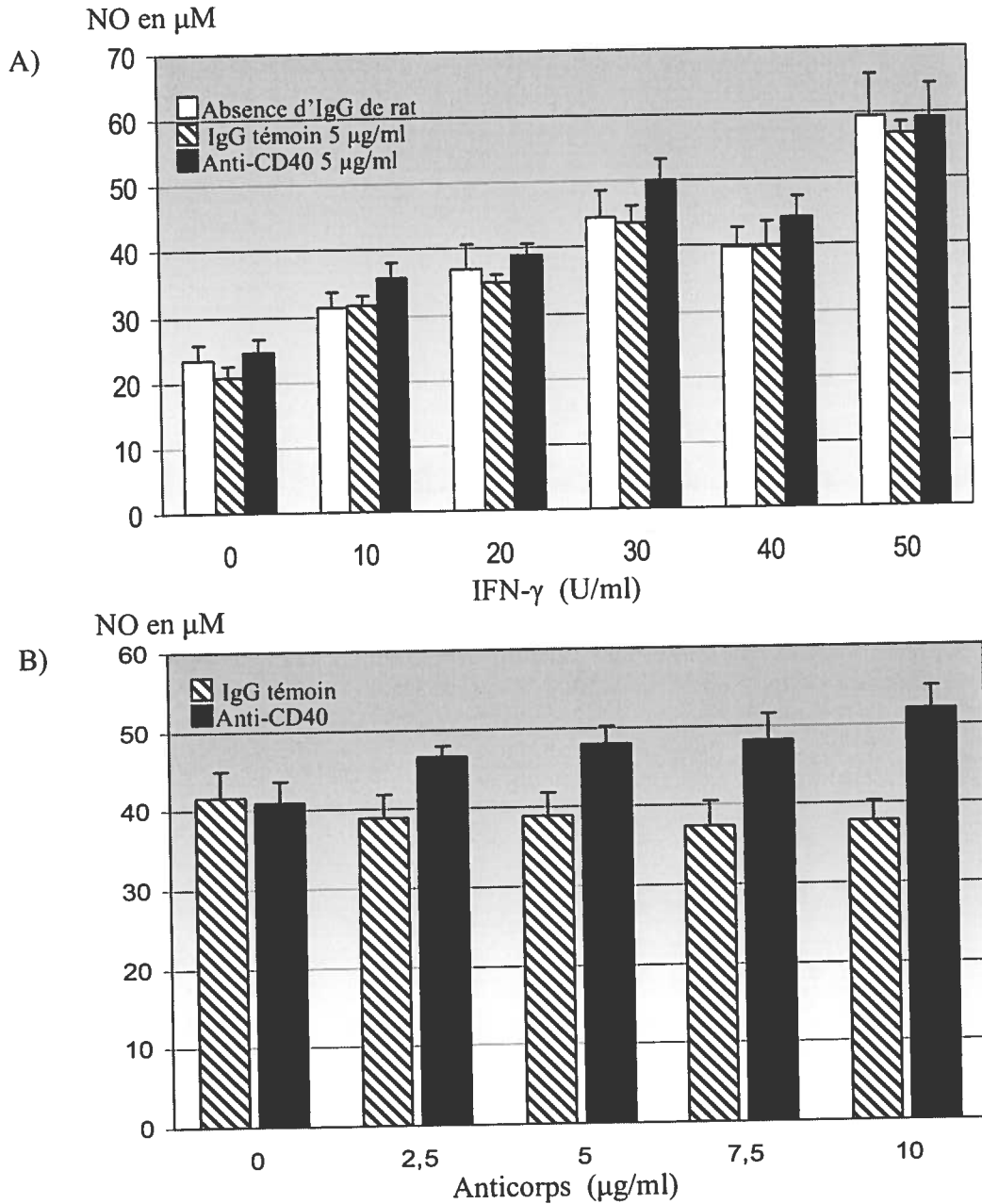


Figure 17: Production de NO par des cellules RAW 264.7 cultivées en présence d'IFN- γ puis mises en contact avec des anticorps anti-CD40 immobilisés

- a) Les cellules ont été cultivées d'abord avec des doses variables d'IFN- γ puis transférées dans les puits d'une microplaque tapissés avec des anticorps anti-CD40 ou des IgG de rat témoin selon la procédure décrite dans la section méthodologie. La concentration des anticorps était de 5 $\mu\text{g/ml}$.
- b) Les cellules ont été cultivées d'abord avec 35 U/ml d'IFN- γ puis transférées dans les puits d'une microplaque tapissés avec des anticorps anti-CD40 ou des IgG de rat témoin en concentration variables.

Les résultats illustrés correspondent à la moyenne de 3 à 6 puits.

pré-cultivées avec 30 et 40 U/ml d'IFN- γ . Cette observation est intéressante étant donné qu'à de telles concentrations, l'expression du récepteur Ly49B est augmentée d'un facteur moyen se situant entre 16 et 19X (voir Fig. 6).

Nous avons choisi de stimuler les cellules avec une dose intermédiaire d'IFN- γ , soit 35 U/ml, pour ajuster, en un deuxième temps, la concentration optimale de l'anticorps anti-CD40. L'expérience illustrée dans la figure 17B montre que la plus grande différence s'observe lorsque la quantité d'anticorps anti-CD40 utilisée pour tapisser les puits de culture est de 10 μ g/ml. Au-delà de cette concentration, la différence de production de NO est constante (résultats non-illustrés).

Avant de tester l'effet de l'engagement simultané du récepteur Ly49B, nous avons fait quelques expériences supplémentaires pour nous assurer de la reproductibilité des résultats. Pour cette série d'expériences, nous avons diminué la concentration cellulaire par unité de surface pour l'étape de culture avec l'IFN- γ dans l'espoir de réduire la production de NO induite par cette cytokine, dont l'utilisation avait essentiellement pour but d'augmenter l'expression des deux récepteurs d'intérêt. Nous espérions ainsi augmenter la différence entre les cellules cultivées ou non en présence des anticorps anti-CD40 immobilisés. Les concentrations de cellules que nous avons choisies correspondent à celles utilisées par d'autres auteurs pour évaluer l'effet d'inhibiteurs de la production de NO dans des cellules RAW 264.7 (Ishii *et al.*, 2005). Les données de six expériences individuelles sont présentées dans le Tableau 1. Nous y notons que dans les conditions modifiées : 1) la culture des cellules non activées en présence des anticorps anti-CD40 ou des IgG témoins ne modifie pas la production basale du NO; 2) la culture préalable des cellules avec 35 U/ml d'IFN- γ n'augmente plus que faiblement la production de NO, 3) l'incubation des cellules avec les anticorps anti-CD40 accroît de 42 à 94% (moyenne : 64,3 +/- 19,8) la production de NO induite par l'IFN- γ et 4) l'incubation avec des IgG témoins induit une augmentation maximale de 22% dans une seule des six expériences effectuées pour une augmentation moyenne non éloquente de 7,7 +/- 9,2. Bien que l'amplitude de la réponse ait varié d'une expérience à l'autre, une nette augmentation de la production de NO attribuable à l'engagement de CD40 par l'anticorps agoniste a été obtenue dans tous les cas. Nous estimons que ces conditions sont appropriées pour évaluer l'effet de l'engagement simultané du récepteur Ly49B avec l'anticorps 3LP218.

Tableau I: Augmentation de la production de NO suite à l'engagement de CD40 sur des cellules RAW 264.7 cultivées en présence d'IFN- γ

Expérience	Production de NO ^{a)b)}						Augmentation de la production de NO en présence d'anticorps immobilisés ^{c)}	
	Préculture en absence d'IFN- γ			Préculture avec 35 U/ml d'IFN- γ			Isotype	Anti-CD40
	Milieu	Isotype	Anti-CD40	Milieu	Isotype	Anti-CD40		
1	24,28	22,84	26,71	26,74	26,71	40,73	-0,11%	52,32%
2	19,72	19,25	21,13	20,83	22,05	32,82	5,86%	57,56%
3	31,05	28,23	29,37	29,31	33,24	45,73	13,41%	56,02%
4	31,34	28,25	29,19	29,52	36,03	54,17	22,05%	83,50%
5	28,21	25,72	28,70	30,59	29,51	43,74	-3,53%	42,99%
6	22,94	18,10	24,03	27,52	29,82	53,35	8,36%	93,86%

a) La production de NO à été mesurée par la technique de Greiss tel que mentionné dans la section méthodologie. Elle est ici exprimée en μ M.

b) Les mesures ont été effectuées sur des cellules RAW 264.7 précultivées pendant 18 h en présence ou non d'IFN- γ avant d'être placées pendant 18 h dans des puits tapissés d'anticorps

c) Les pourcentage d'augmentation présentés dans ce tableau ont été calculés dans chaque cas par rapport aux concentrations de NO dans le milieu sans anticorps. Ils représentent la variation de production de NO par des cellules RAW 264.7 cultivées avec 35 U/ml d'IFN- γ qui est attribuable à l'incubation en présence d'anti-CD40 ou de son isotype.

Afin de tester l'effet de l'engagement simultané du récepteur Ly49B, les puits d'une microplaque de culture, préalablement tapissés avec des fragments F(ab')₂ d'IgG de chèvre spécifiques du fragment Fc des IgG de rat, ont été incubés avec un mélange contenant 10 µg/ml d'anticorps anti-CD40 et des quantités variables d'anticorps anti-Ly49B 3LP218 et/ou de son témoin isotypique pour une concentration totale de 10 µg/ml (Fig. 18) ou en présence d'une concentration croissante d'anti-Ly49B ou de son témoin isotypique (5-20 µg/ml) (Fig. 19). Après une nuit d'incubation à 4°C, le mélange a été aspiré et les anticorps non fixés ont été éliminés par lavage des puits avec du milieu de culture. Des cellules RAW 264.7, pré-cultivées en présence de 35 U/ml d'IFN-γ, ont été transférées dans les puits de la microplaque et celle-ci a été incubée durant 18 h à 37°C. Chaque condition a été testée en triplicata. Des échantillons de surnageants ont ensuite été prélevés pour le dosage de la quantité de NO.

Dans les deux expériences illustrées dans les figures 18 et 19, l'incubation des cellules cultivées en présence d'IFN-γ dans les puits tapissés d'anti-CD40 entraîne une augmentation manifeste de la production de NO. Tel qu'attendu, l'effet est le même lorsque les puits des macrophages ont été tapissés avec un anticorps dirigé contre le récepteur Ly49G2, un récepteur qui n'est pas exprimé sur les macrophages. Cependant, le remplacement progressif (Fig. 18) ou la substitution (Fig. 19) de cet anticorps par l'anticorps anti-Ly49B ne réduit pas non plus la production de NO attribuable à l'engagement de CD40. Ces résultats suggèrent deux interprétations : soit que la production de NO induite lors de l'engagement de CD40 n'est pas régulée lors de l'engagement du récepteur Ly49B, soit que l'anticorps 3LP218 n'est pas agoniste.

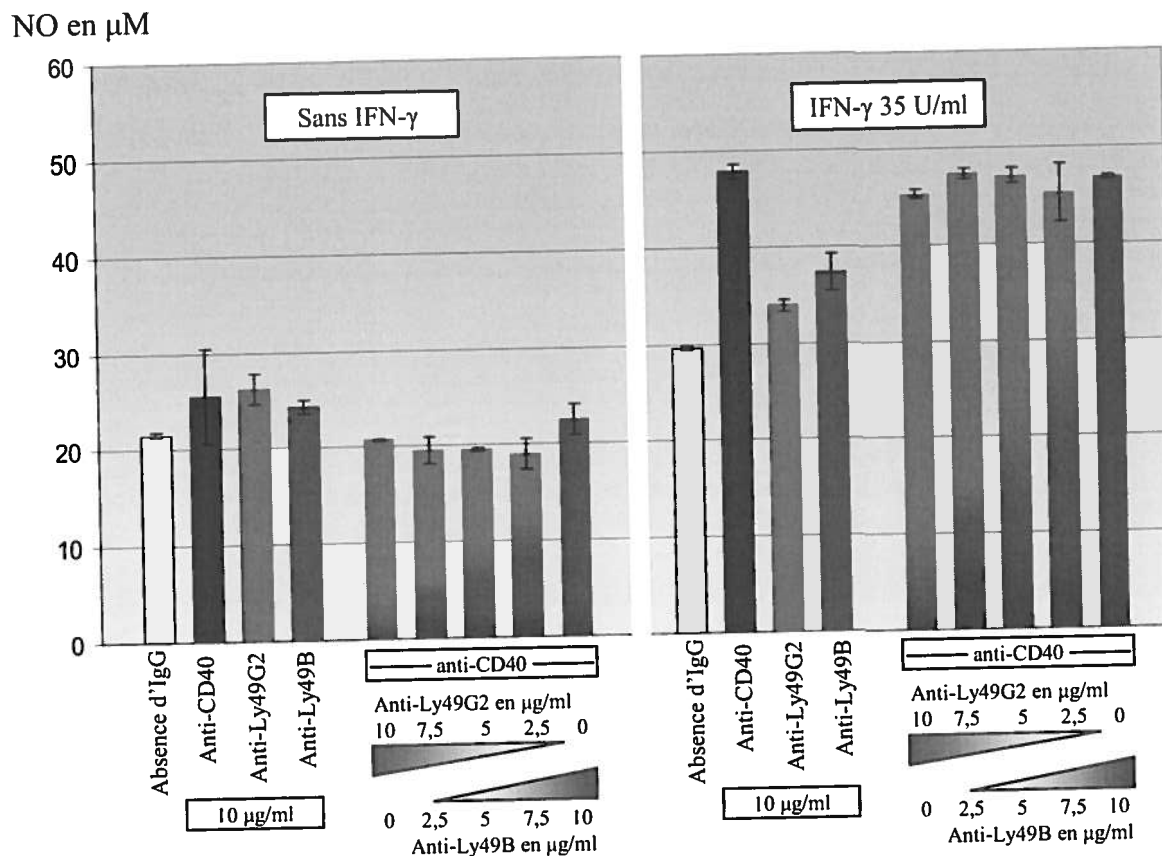


Figure 18: Effet de l'engagement du récepteur Ly49B par des anticorps immobilisés (3LP218 et isotype) sur la production de NO induite via CD40

Les cellules cultivées seules ou avec 35 U/ml d'IFN- γ ont été transférées dans des puits de culture tapissés avec les réactifs indiqués. La production de NO a été mesurée selon la méthode de Greiss telle que décrite dans la section méthodologie. Chaque condition illustrée a été testée en triplicata. L'anticorps anti-Ly49G2 (IgG2b) reconnaît un récepteur non exprimé sur les cellules RAW 264.7. Il sert de témoin isotypique pour l'anticorps anti-Ly49B.

NO en μM

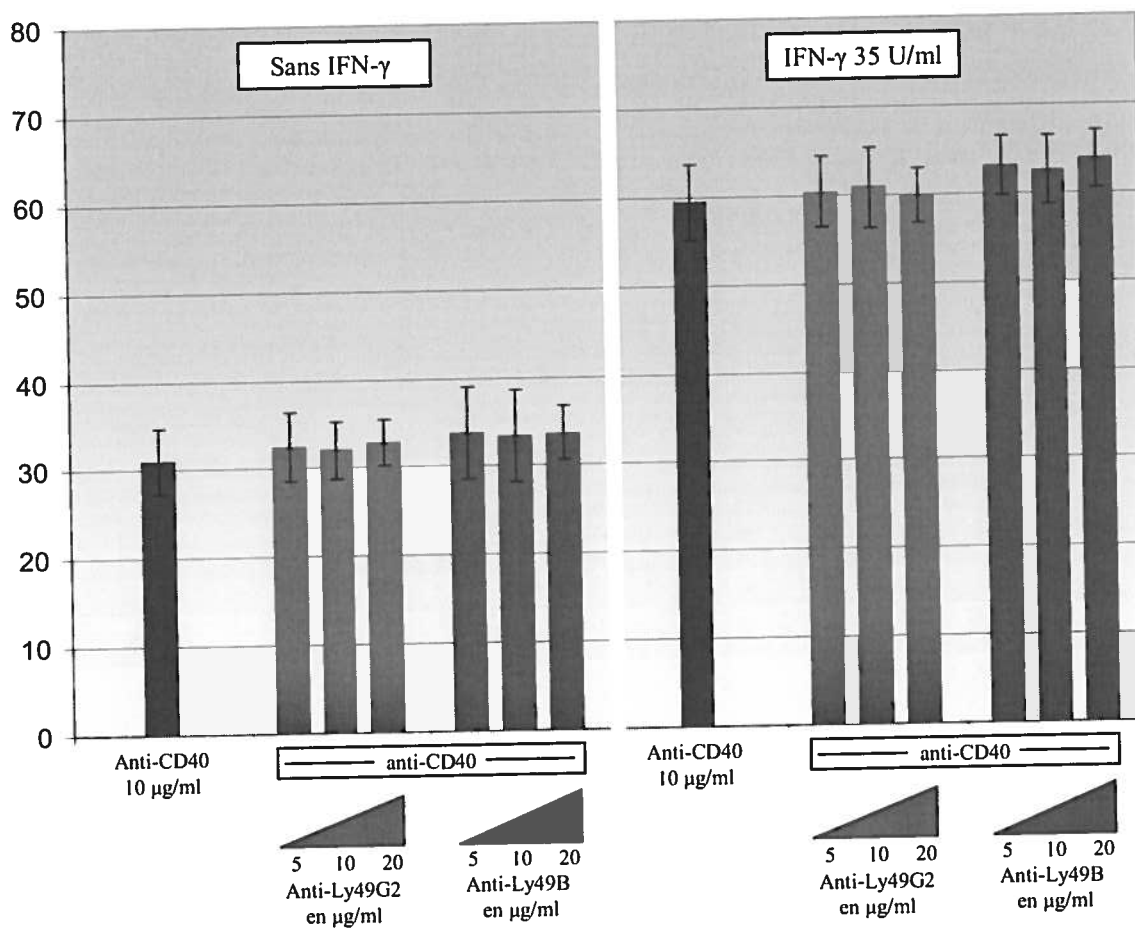


Figure 19: Effet de l'engagement du récepteur Ly49B par des anticorps immobilisés (3LP218 ou isotype) sur la production de NO induite via CD40

Les cellules cultivées seules ou avec 35 U/ml d'IFN- γ ont été transférées dans des puits de culture tapissés avec les réactifs indiqués. La production de NO a été mesurée selon la méthode de Greiss telle que décrite dans la section méthodologie. Chaque condition illustrée a été testée en triplicata. L'anticorps anti-Ly49G2 (IgG2b) reconnaît un récepteur non exprimé sur les cellules RAW 264.7. Il sert de témoin isotypique pour l'anticorps anti-Ly49B.

2.2 - Effet de l'engagement du récepteur Ly49B sur la réorganisation du cytosquelette

En 2004, l'équipe de Toyama-Sorimachi a démontré qu'un récepteur Ly49, le récepteur Ly49Q, était exprimé à la surface des macrophages, mais pas sur les cellules NK1.1⁺. En étudiant l'expression de ce récepteur sur les leucocytes du sang et de la moelle osseuse, les auteurs ont conclu que le récepteur Ly49Q était présent sur des cellules de la lignée myéloïde et que son expression diminuait avec la maturation des cellules. Le récepteur Ly49Q a également été décelé sur les cellules péritonéales prélevées 4 jours après l'inoculation de thioglycollate de même que sur les cellules des lignées J774 et RAW 264.7. Comme dans le cas du récepteur Ly49B, l'expression du récepteur Ly49Q est modulée à la hausse lorsque les macrophages sont cultivés en présence d'IFN- γ . Les anticorps anti-Ly49Q n'affectent ni la production d'IL-12, ni la production de NO et ne modifient pas la phagocytose. Cependant, des changements morphologiques caractérisés par l'élongation des cellules et la formation de lamellipodes et de filipodes ont été notés lorsque des cellules RAW 264.7 (ou des cellules péritonéales induites par le thioglycollate et préstimulées par l'IFN- γ) ont été mises en contact avec les anticorps anti-Ly49Q immobilisés. Les auteurs ont émis l'hypothèse que le récepteur Ly49Q pouvait être impliqué dans la réorganisation du cytosquelette des macrophages (Toyama-Sorimachi *et al*, 2004). Considérant que les récepteurs Ly49B et le Ly49Q sont tous les deux présents sur les cellules RAW 264.7, il était pertinent de déterminer si de telles modifications étaient également décelables lors de l'incubation des cellules dans des puits tapissés avec des anticorps anti-Ly49B.

Des cellules RAW 264.7 cultivées 18 h en présence ou en absence de 50 ou 100 U/ml d'IFN- γ ont été transférées dans des plaques à 6 puits qui avaient été tapissés avec l'anticorps 3LP218 ou avec un anticorps isotypique IgG2b. L'observation des cellules au microscope après 10 min, 20 min, 2 h, 12 h et même 24 h de culture n'a révélé aucune modification du cytosquelette. L'engagement du récepteur Ly49B avec l'anticorps 3LP218 n'a donc pas induit de modification du cytosquelette (résultats non-illustrés). Il se

peut que, contrairement au récepteur Ly49Q, le récepteur Ly49B n'influence pas l'architecture du cytosquelette des macrophages RAW 264.7. Cependant, il est aussi possible que l'on n'observe aucune modification morphologique de ces cellules du fait que l'anticorps 3LP218 ne serait pas un anticorps agoniste pour le récepteur Ly49B.

3 - Localisation du récepteur Ly49B dans les cellules RAW 264.7

Certains récepteurs membranaires sont exprimés de manière localisée à la surface des cellules selon les fonctions dans lesquelles ils interviennent. Par exemple, les intégrines qui participent à l'adhésion des macrophages aux autres cellules ou à la matrice extracellulaire sont exprimées de manière asymétrique à la surface de ces cellules et se concentrent notamment aux niveaux des pseudopodes et dans les zones de contacts cellulaires (Cox et Huttenlocher 1998). Les protéines Rab5 et Flotilline-1 sont impliquées dans la formation de phagosomes. Ces protéines sont concentrées dans des zones spécialisées à la surface des macrophages et participent à la formation de vésicules (Dermine *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2003).

Puisque l'engagement du récepteur Ly49B avec l'anticorps 3LP218 ne nous a pas permis d'identifier une fonction dans laquelle le récepteur Ly49B serait impliqué, nous avons pensé que l'étude de la localisation intracellulaire et membranaire du récepteur Ly49B par microscopie confocale pourrait peut-être orienter nos recherches ultérieures concernant son rôle biologique.

Conformément au protocole décrit dans la section méthodologie, des cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence ou non d'IFN- γ [100 U/ml] durant 18 h sur des lamelles placées dans des plaques de 24 puits. Les macrophages ayant adhéré aux lamelles ont été fixés, leurs parois perméabilisées et les cellules ont été marquées à l'aide d'anticorps dirigés contre le récepteur Ly49B et de réactifs spécifiques de l'actine (Phalloïdine) ou des noyaux (DRAQ5). Un second anticorps dirigé contre les IgG2b de rat couplé au fluorochrome AlexaFluor a été ajouté afin de révéler la fixation de l'anti-Ly49B.

Dans les photographies présentées dans les figures 20 et 21, la fluorescence bleue correspond aux noyaux, la fluorescence rouge identifie les microfilaments du cytosquelette et la fluorescence verte localise les récepteurs Ly49B. Conformément à ce que nous avons déjà noté dans les expériences de cytométrie en flux, l'expression du récepteur Ly49B dans les cellules RAW 264.7 non activées est très faible comparativement à ce qui est observé dans les cellules cultivées en présence d'IFN- γ (Comparer les images B2 et B3 des Fig. 20 et 21). Ceci semble indiquer que l'augmentation de l'expression de ce récepteur dans les cellules activées ne correspond pas à un transfert vers la membrane cytoplasmique de protéines déjà synthétisées et stockées dans des vésicules intracytoplasmiques, mais serait plutôt attribuable à une synthèse *de novo* de cette protéine. Toutefois, l'utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique, comme la cycloheximide serait requise pour que nous puissions confirmer ou non cette hypothèse (Schilling *et al.*, 2002).

L'activation des cellules par l'IFN- γ entraîne des modifications de la morphologie cellulaire qui se manifestent notamment par une fréquence plus grande de cellules de plus grande taille et ayant de nombreux pseudopodes. Cependant la répartition diffuse du récepteur Ly49B dans les cellules activées n'a rien révélé qui puisse nous aider à préciser sa fonction.

Au terme de ce travail de recherche nous avons pu mieux cerner les conditions d'activation cellulaire qui entraînent la modulation de l'expression du récepteur inhibiteur Ly49B, mais malheureusement, les fonctions du macrophage dans lesquelles il intervient restent encore un mystère.

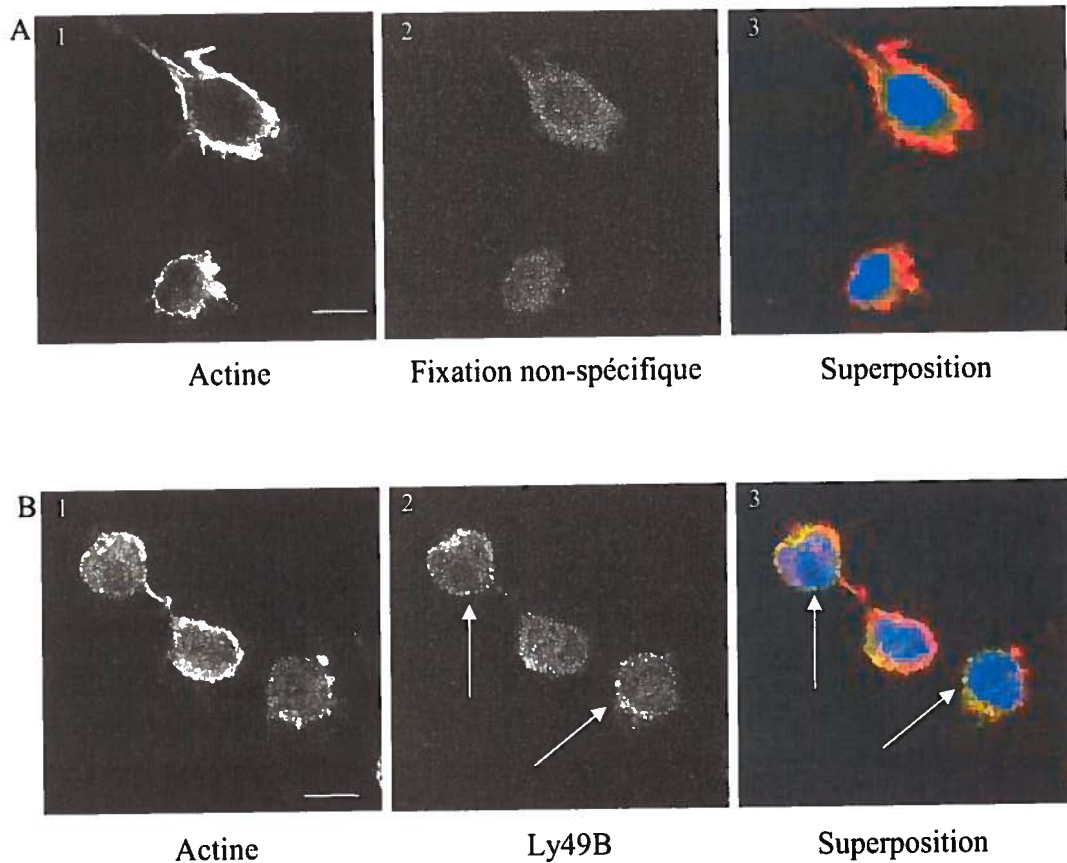


Figure 20 : Localisation du récepteur Ly49B dans des cellules RAW 264.7 non stimulées

Des cellules RAW 264.7 cultivées dans du milieu ne contenant aucun agoniste ont été fixées, leurs parois perméabilisées puis marquées à l'aide de l'anticorps 3LP218 spécifique au récepteur Ly49B (Fig.B) ou avec un anticorps témoin du même isotype (Fig. A) puis avec un anticorps de chèvre anti-IgG2b de rat, conjugué au fluorochrome AlexaFluor, comme second anticorps (fluorescence verte) (Fig. 2 & 3). Ces mêmes macrophages ont également été marqués avec de la phalloïdine afin de détecter les filaments d'actine (fluorescence rouge) (Fig. 1 & 3) ainsi que du DRAQ5 comme marqueur spécifique des noyaux (fluorescence bleue) (Fig. 3)

Barre = 3 μ m

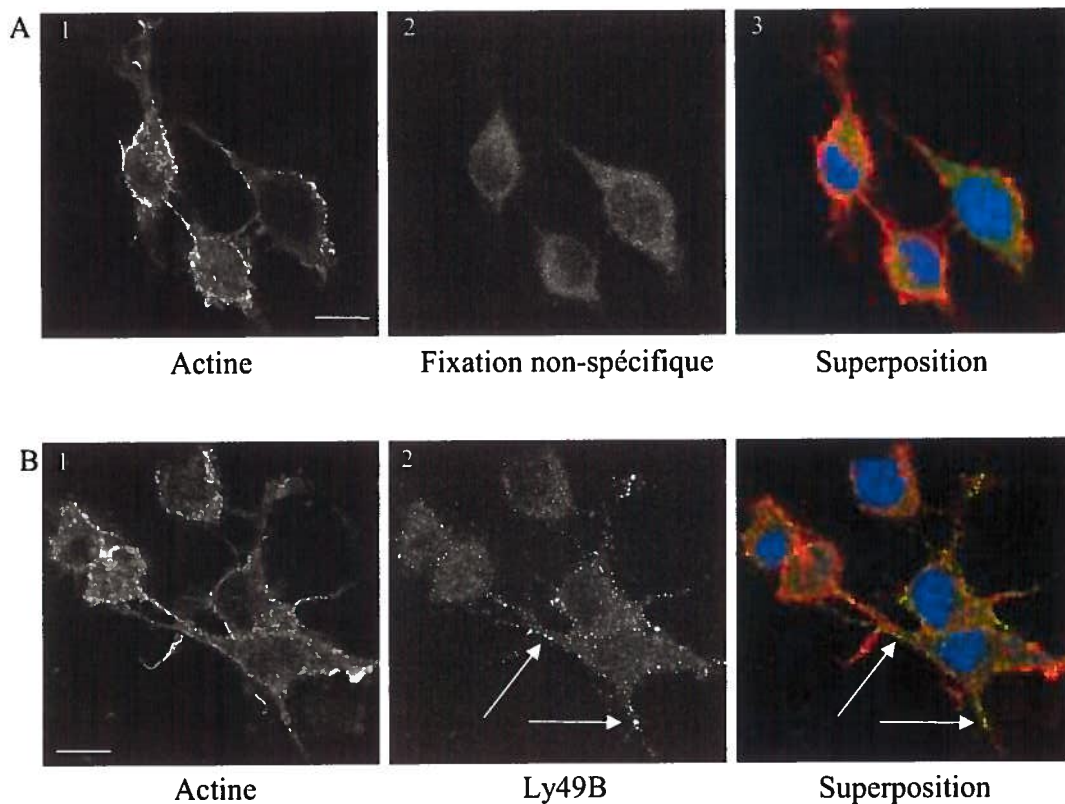


Figure 21 : Localisation du récepteur Ly49B dans des cellules RAW 264.7 cultivées en présence de 100 U/ml d'IFN- γ

Des cellules RAW 264.7 cultivées en présence d'IFN- γ ont été fixées, leurs parois perméabilisées puis marquées à l'aide de l'anticorps 3LP218 spécifique au récepteur Ly49B (Fig.B) ou avec un anticorps témoin du même isotype (Fig. A) puis avec un anticorps de chèvre anti-IgG2b de rat, conjugué au fluorochrome AlexaFluor, comme second anticorps (fluorescence verte) (Fig. 2 & 3). Ces mêmes macrophages ont également été marqués avec de la phalloïdine afin de détecter les filaments d'actine (fluorescence rouge) (Fig. 1 & 3) ainsi que du DRAQ5 comme marqueur spécifique des noyaux (fluorescence bleue) (Fig. 3)

Barre = 3 μ m

V - DISCUSSION

Les résultats exposés dans ce mémoire démontrent que l'induction de l'expression du récepteur inhibiteur Ly49B sur des macrophages activés constitue une réponse sélective dépendante de la nature des récepteurs via lesquels les cellules sont activées. Lorsque des récepteurs appropriés sont engagés, la réponse peut être induite à des concentrations d'agonistes nettement inférieures à celles requises pour obtenir une réponse optimale. Cette observation suggère que l'augmentation d'expression de ce récepteur inhibiteur en surface cellulaire instaure la mise en place d'un mécanisme destiné à réguler une ou plusieurs des fonctions acquises par les macrophages suite à leur activation via les récepteurs concernés. Considérant le grand nombre de gènes dont la transcription et la traduction sont diminuées ou augmentées dans des conditions d'activation analogues à celles que nous avons utilisées, l'identification de la ou des fonctions régulées par ce récepteur inhibiteur ne sera pas tâche facile. Nous disposons d'un anticorps monoclonal grâce auquel nous avons pu suivre la modulation de l'expression du récepteur Ly49B dans différentes conditions d'activation, mais nous n'avons pu ni confirmer ni infirmer que ce réactif puisse avoir des propriétés agonistes. L'analyse par microscopie confocale de cellules RAW 264.7 activées ou non avec de l'IFN- γ (Fig. 20 et 21) suggère que l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B sur les cellules activées serait due à une synthèse *de novo* et non à l'exportation en surface cellulaire de molécules stockées dans des vésicules cytoplasmiques. Cependant, la répartition du récepteur Ly49B sur les cellules activées étant diffuse, nous ne disposons pour l'instant d'aucune indication particulière qui puisse nous aider à orienter la recherche d'une fonction. Par ailleurs, les résultats exposés dans ce mémoire attestent que nous avons beaucoup progressé dans la connaissance des conditions qui régissent la modulation de l'expression du récepteur Ly49B sur des macrophages activés.

Suite à l'activation des cellules RAW 264.7 par le LPS ou l'IFN- γ en conditions optimales, la valeur relative de l'expression du récepteur Ly49B est de 10 à 20 fois

supérieure au niveau basal décelé sur les cellules non activées (Fig. 6 et 7). Kota *et al.*, ont récemment publié un article dans lequel ils analysent des gènes dont la transcription est amplifiée par l'IFN- γ dans les cellules RAW 264.7 (Kota *et al.*, 2006). Il en ressort que les ARNm codant pour l'IL-15 et le TNF- α ainsi que pour leurs récepteurs spécifiques de même que pour celui de l'IL-18 sont augmentés lorsque les cellules RAW 264.7 sont cultivées 4 h en présence de 1000 U/ml d'IFN- γ . D'autres auteurs font mention d'une expression accrue du récepteur de l'IL-12 sur des macrophages de la lignée RAW.309 stimulés par l'IFN- γ (Grohmann *et al.*, 2001). Nous avons évalué le rôle de l'IL-12 et de l'IL-18 sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B sur les cellules RAW 264.7. Ces deux cytokines seules ou combinées n'ont induit aucune augmentation de l'expression du récepteur Ly49B sur ces cellules (résultats non illustrés). Cette observation est en accord avec celles de Golab et collaborateurs qui n'observent pas d'effet de ces cytokines sur la production de NO par les cellules RAW 264.7 alors que leur présence combinée dans des cultures de cellules péritonéales adhérentes induit la production de NO mais aussi d'IFN- γ (Golab *et al.*, 2000). Cependant, peut-être aurions-nous observé une réponse différente si les cellules avaient été stimulées d'abord avec de l'IFN- γ qui aurait alors augmenté l'expression des récepteurs pour ces deux cytokines. Nous ne pouvons donc exclure complètement la possibilité que l'IL-12 et l'IL-18 interviennent dans la modulation de l'expression du récepteur Ly49B dans les cellules RAW 264.7 avant qu'une telle expérience ait été réalisée. Le cas échéant, ce serait un autre exemple de synergie avec l'IFN- γ . L'IL-15 ne faisait pas partie des cytokines dont nous avons mesuré l'effet sur la modulation de l'expression du récepteur Ly49B par les cellules RAW 264.7. Il pourrait être intéressant de le faire étant donné que des auteurs ont rapporté que l'IL-15 augmente la transcription du gène de l'IFN- β dans ces cellules (Liu *et al.*, 2004) et que l'IFN- β endocrine est un intermédiaire important dans la régulation de l'expression du récepteur Ly49B (Fig 10).

Alors qu'il n'a produit aucun effet dans les cultures ne contenant aucune autre cytokine, le TNF- α a, quant à lui, induit une modulation inattendue de l'expression du récepteur Ly49B en présence d'IFN- γ . Le TNF- α agit généralement comme facteur

amplificateur dans l'activation classique du macrophage, mais cette cytokine aurait plutôt un effet antagoniste sur l'augmentation de l'expression du récepteur Ly49B induite par l'IFN- γ (Fig. 13). Aux concentrations que nous avons utilisées dans nos expériences, deux autres équipes ont également noté un effet inhibiteur de l'action combinée de ces deux cytokines notamment sur l'expression des molécules de classe II du CMH sur des cellules RAW 264.7 (Wynn, Freund et Paulnock 1992) ou sur la sécrétion d'IL-12 par des macrophages péritonéaux (Hodge-Dufour *et al.*, 1998). Bien que l'on sache peu de choses concernant les propriétés antagonistes du TNF- α et de l'IFN- γ sur les macrophages, il semblerait que le TNF- α puisse avoir un rôle à jouer dans la diminution de l'amplitude et la durée de la réponse inflammatoire (Marino *et al.*, 1997). Il serait intéressant d'évaluer si le TNF- α endogène intervient dans la modulation de l'expression du récepteur Ly49B. Considérant l'effet observé dans les cultures contenant les deux cytokines, on pourrait s'attendre à ce que l'effet de l'IFN- γ soit amplifié dans des cultures contenant des anticorps anti-TNF- α .

En ce qui a trait à l'activation alternative des macrophages, les résultats que nous avons obtenus lorsque les cellules RAW 264.7 ont été cultivées en présence d'IL-4 seule indiquent que l'expression du récepteur Ly49B ne semble pas être affectée par la présence de cette cytokine (Fig. 15). Toutefois, nous avons pu observer une légère diminution du niveau d'expression du récepteur Ly49B lorsque les cellules RAW 264.7 étaient cultivées en présence simultanée d'IFN- γ et d'IL-4. D'autres auteurs ont démontré un tel effet antagoniste entre l'IL-4 et l'IFN- γ sur des macrophages. Becker et Daniel ont notamment mesuré, par cytométrie en flux, une diminution du niveau d'expression des récepteurs FCRI et FCRII lorsque de l'IL-4 (0,5 ng/ml) était ajoutée dans le milieu de culture de monocytes ou de macrophages humains cultivés durant 40 h en présence d'IFN- γ (50 U/ml) (Becker et Daniel 1990). L'équipe de Hunt a également observé un effet inhibiteur de l'IL-4 (10 ng/ml) sur la production de TNF- α par des cellules RAW 264.7 préactivées avec du LPS (Hunt *et al.*, 2002). L'IL-4 n'entraîne pas une inactivation des macrophages, mais une activation spécifique appelée activation alternative, distincte de celle induite par l'IFN- γ ou le LPS et que l'on retrouve essentiellement dans un contexte de réponse immunitaire de type Th2. De nombreux gènes dont la transcription est amplifiée par l'IFN- γ sont affectés à l'inverse par l'IL-4. C'est le cas notamment pour

l'ensemble des récepteurs Fc γ R dont l'expression augmentée en présence d'IFN- γ est réduite lorsque les cellules sont aussi en présence d'IL-4 (Paludan 1998). C'est aussi le cas pour la production d'IL-12 et de TNF- α de même que pour la production de NO et des dérivés oxygénés. Paludan précise cependant que l'IL-4 peut avoir un effet antagoniste à l'effet induit par de faibles doses d'IFN- γ (10 U/ml), mais pas par de fortes doses (100 U/ml). Ainsi, bien qu'il serait intéressant de confirmer le rôle de l'IL-4 sur l'inhibition de l'expression du récepteur Ly49B sur les cellules RAW 264.7 activées par l'IFN- γ , notamment avec de plus fortes doses d'IL-4 et de plus faibles doses d'IFN- γ , on sait d'ores et déjà que la présence d'IL-4 dans le milieu de culture des macrophages n'induit pas d'augmentation du niveau d'expression du récepteur Ly49B. Le récepteur Ly49B ne serait donc probablement pas impliqué dans la régulation de l'immunité humorale, la lutte anti-parasitaire et les réponses allergiques qui sont autant de fonctions induites lors de l'activation des macrophages par la voie alternative.

Parmi les innombrables gènes dont la transcription est augmentée suite à l'activation des macrophages via l'IFN- γ et le LPS, on en compte plusieurs qui codent pour des facteurs impliqués dans la transcription, la liaison à l'ADN, les cascades signalétiques ou encore pour des cytokines à action potentiellement autocrine et leurs récepteurs (Lang *et al.*, 2002; Kota *et al.*, 2006; Schroder, Sweet et Hume 2006). Un ou des médiateurs intermédiaires sont sans doute en jeu dans la modulation de l'expression du récepteur Ly49B par l'IFN- γ puisque la survenue d'un signal via TLR4, le récepteur du LPS, sur des cellules déjà stimulées avec une concentration sub-optimale d'IFN- γ se traduit par un facteur d'augmentation d'expression supérieur à l'action cumulative des deux agonistes concernés (Fig. 14). Plusieurs mécanismes d'amplification peuvent être envisagés. Nous avons établi la participation déterminante de l'IFN- β autocrine dans la réponse induite par le LPS (Fig.11), mais d'autres facteurs sont vraisemblablement impliqués. En effet, la réponse optimale obtenue lorsque les cellules sont cultivées dans du milieu contenant des concentrations optimales d'IFN- β reste inférieure à celle obtenue en présence de LPS (Fig. 6 et 9).

L'effet synergique entre l'IFN- γ et le LPS en ce qui a trait à la production de NO (via l'induction de iNOS dans les cellules RAW 264.7) est connu depuis longtemps (Le

Page *et al*, 1996). L'activation conjointe des facteurs de transcription STAT1 et NF κ B (voies de signalisation de l'IFN- γ et du TLR4, respectivement) entraîne une amplification de la transcription des gènes codant pour des protéines de la voie métabolique de production de NO (Held *et al*, 1999; Zhu *et al*, 2006). Un effet synergique de ces deux activateurs s'applique aussi à la modulation de l'expression du récepteur Ly49B (Fig. 14). Étonnamment, une synergie encore plus marquée a été notée lorsque de l'IL-10 plutôt que du LPS était ajoutée à des cellules en culture dans du milieu contenant une concentration sub-optimale d'IFN- γ (Fig. 16). L'IL-10 est surtout considérée comme une cytokine anti-inflammatoire, elle limite l'intensité des réponses à plusieurs stimuli, notamment la production de plusieurs cytokines, l'expression de molécules de co-stimulation et la sécrétion de chimiokines (Pestka *et al*, 2004). Bien qu'elle supprime plusieurs des réponses induites par l'IFN- γ ou le LPS (dont la production de TNF- α), elle augmente la production de NO par des macrophages péritonéaux résidents et des cellules RAW 264.7, mais elle inhibe la même fonction lorsque les macrophages péritonéaux ont été induits au thioglycollate (Nemoto *et al*, 1999; Zidek et Frankova 1999). En étudiant la modulation des gènes par matrice d'ADN suite à l'activation par l'IL-10 de macrophages stimulés par le LPS, Lang et collaborateurs ont identifié que seulement une quinzaine de gènes dont la transcription est induite par le LPS étaient encore plus fortement amplifiés en présence d'IL-10 (Lang *et al*, 2002). Les auteurs ont notamment observé un effet synergique de l'IL-10 et du LPS sur la synthèse des ARNm codant pour quelques protéines de surface dont la P-selectine, le récepteur de l'IL-4, le récepteur du G-CSF, le récepteur FcRII, un récepteur de l'adénosine, des récepteurs Scavenger et le récepteur de l'IFN de type I (IFN α R2b). L'ARNm du gène de l'IFN- β étant lui-même fortement augmenté dans les cellules activées par l'IL-10 et le LPS, nous faisons l'hypothèse que l'effet synergique que nous avons observé entre l'IL-10 et l'IFN- γ , eu égard à l'expression du récepteur Ly49B, pourrait bien être lui aussi attribuable à l'augmentation de l'effet de l'IFN- β autocrine. En accord avec les observations de Lang et collaborateurs, une autre équipe a récemment rapporté la production simultanée d'IL-10 et d'IFN- β par des macrophages dérivés de la moelle osseuse stimulés par le LPS (Boonstra *et al*, 2006). En faisant les mêmes mesures avec des cellules obtenues de souris déficientes pour les protéines adaptatrices MyD88 ou TRIF, ces auteurs ont également démontré que l'IL-10 endogène

produite par les cellules activées par le LPS était dépendante des voies MyD88 et TRIF alors qu'à l'instar de l'IFN- β , elle dépendait essentiellement de la voie TRIF lorsque les cellules étaient activées par le Poly(I:C). Il importe de souligner que ces deux cytokines sont aussi produites de manière strictement dépendante de la voie MyD88 lorsque ces cellules sont activées via TLR9. Toutefois, la quantité d'IFN- β produite lors de l'activation des cellules RAW 264.7 via TLR9 est inférieure à celles résultant de l'activation avec le LPS ou le Poly(I:C) (Boonstra *et al*, 2006; Jiang et Pisetsky 2006). Dès lors, la faible augmentation d'expression du récepteur Ly49B que nous avons observée après stimulation des cellules RAW 264.7 par un agoniste de TLR9 (Fig. 9) mériterait sans doute d'être explorée plus en profondeur. Il se pourrait en effet que l'augmentation du niveau d'expression du récepteur Ly49B que l'on observe lorsque les cellules RAW 264.7 sont activées via TLR9, soit en réalité due à une sécrétion puis une reconnaissance autocrine de l'IFN- β et/ou de l'IL-10.

Tout comme l'IFN- β , l'IFN- α pourrait peut-être participer à l'induction de l'expression du récepteur Ly49B. Une équipe s'intéressant à la production de la protéine HMGB1 (High mobility group protein 1) a démontré le rôle de l'IFN- α autocrine dans la régulation de sa production (Jiang et Pisetsky 2006). HMGB1 est une protéine soluble qui favorise l'interaction entre l'ADN et certains facteurs de transcription dans le noyau, et qui agit aussi comme une cytokine pro-inflammatoire lorsqu'elle est sécrétée. Utilisant des conditions semblables aux nôtres, ces chercheurs ont observé que la sécrétion de la protéine HMGB1 s'accompagnait de la production d'IFN- α lorsque les cellules RAW 264.7 étaient stimulées avec du Poly(I:C) mais non avec du LPS. L'IFN- α autocrine serait presque entièrement responsable de la production de la protéine HMGB1. Cette cytokine agissant de manière autocrine pourrait peut-être aussi entrer en jeu dans la modulation de l'expression du récepteur Ly49B. Comme nous l'avons fait pour confirmer le rôle de l'IFN- β endogène, l'ajout, au milieu de culture, d'anticorps dirigés contre l'IFN- α serait approprié pour aborder cette question. Rappelons cependant que l'activation des cellules RAW 264.7 par le Poly(I:C) entraîne une modulation de l'expression du récepteur Ly49B qui, en conditions optimales, demeure beaucoup moins marquée que lors de l'activation des cellules par le LPS ou l'IFN- γ . La modulation du récepteur Ly49B dans différents types de cellules de souris B6, dont les macrophages et les cellules dendritiques, vient

d'être rapportée (Gays *et al.*, 2006). Nous y reviendrons un peu plus loin en relatant plusieurs autres observations de cette équipe.

L'IFN- β et l'IFN- α sont reconnus par les mêmes récepteurs à la surface des cellules, le récepteur hétérodimérique IFNAR (interferon alpha receptor). Lorsque le récepteur IFNAR est engagé, il transmet un signal d'activation au noyau par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT notamment via STAT1 (Bonjardim 2005). Une fois engagé, l'IL-10R induit quant à lui l'activation de Jak1 et Tyk2 puis par leur intermédiaire, de STAT1, STAT3 et STAT5 (Wehinger *et al.*, 1996; Pestka *et al.*, 2004). L'engagement de l'IFN- γ avec son récepteur spécifique, le récepteur IFNGR (IFN- γ Receptor), permet l'initiation d'une cascade de phosphorylation impliquant la voie JAK/STAT (JAK1, JAK2, STAT1, STAT5). Les protéines STAT1 phosphorylées peuvent s'homodimériser et aller directement initier la transcription de gènes régulés par les interférons via leur fixation aux promoteurs GAS (Gamma-Interferon Activation Site) dont le site de fixation a pour séquence TTCN₍₂₋₄₎GAA (revue par Schroder *et al.*, 2004). Lorsque l'on étudie la séquence promotrice du gène codant pour le récepteur Ly49B, on constate la présence de trois séquences nucléotidiques qui correspondent aux séquences GAS. Les trois sites de fixation de type GAS se retrouvent en amont du site d'initiation de la transcription et se situent de part et d'autre des boîtes TATA. La majorité des gènes *Ly49* possèdent notamment dans leur région promotrice des séquences Pro1 qui agissent comme commutateurs bidirectionnels ou « probabilistic binary switches », lesquelles contrôlent la transcription des gènes *Ly49* selon les différents stades de maturation des cellules NK (Saleh *et al.*, 2004; Rouhi *et al.*, 2006). Cependant les séquences de type GAS identifiées sont spécifiques au gène *Ly49b* et on ne les retrouve dans aucune des régions promotrices des gènes *Ly49a*, *c*, *d*, *e*, *g*, *h*, *i* ou *j* de la souche murine B6 (Wilhelm *et al.*, 2001). En revanche, il y a présence de plusieurs GAS dans la région promotrice du gène *Ly49q*^{B6} (GenBank). Il est donc possible que ce soit par l'intermédiaire de ces séquences GAS et par l'activation des facteurs de transcription STAT1 que l'IFN- γ , l'IFN- β , l'IL-10 et possiblement l'IFN- α induisent la modulation de l'expression du gène *Ly49b*. L'implication de STAT1 dans cette modulation pourrait être vérifiée par l'ajout dans le milieu de culture d'un inhibiteur spécifique de la

phosphorylation de la protéine STAT1 par JAK1 et JAK2 tel que la molécule 15dPGJ2 (15-deoxy- Δ^{12-14} prostaglandin J₂) (Chen *et al.*, 2003).

Peu d'études ont abordé la régulation de l'expression de récepteurs Ly49 par des cytokines. L'augmentation de la taille relative des populations cellulaires exprimant certains récepteurs Ly49 est souvent la simple conséquence de l'effet prolifératif de la cytokine utilisée. Dans le présent contexte, il convient de porter une attention particulière aux travaux qui ont démontré une augmentation de l'expression des récepteurs en surface cellulaire. Dans cette optique, un autre étudiant de notre laboratoire a observé une faible augmentation du niveau d'expression des récepteurs Ly49C (1,6X) et Ly49G2 (1,8X) sur les cellules T NK1.1⁺ CD4⁻CD8⁻ de la rate de souris B6 cultivées 4 jours en présence d'IL-2 ou d'IL-15 (Perrée 2003). Une augmentation un peu plus marquée de l'expression du récepteur Ly49G2 (2,4X) a aussi été notée sur les cellules NK de la rate cultivées dans les mêmes conditions, mais le récepteur Ly49C n'y était à peu près pas modulé (1,2X). L'expression du récepteur Ly49A, évaluée en parallèle, n'était modulée sur aucun de ces deux types de cellules dans les mêmes conditions de culture. Enfin, la culture des cellules en présence d'IL-12 et d'une minime quantité d'IL-2 n'a entraîné la modulation d'aucun de ces récepteurs. Dans une autre étude, il a été établi que le répertoire des récepteurs Ly49 des cellules NK matures pouvait être sensiblement modifié lors de leur culture en présence de nombreuses cytokines (Gays *et al.*, 2005). Ce groupe rapporte notamment une induction *de novo* du récepteur Ly49E sur les cellules NK matures de la souris B6, mais pas sur les cellules T NK1.1⁺, cultivées en présence d'IL-2 ou d'IL-15. L'IFN- α , l'IFN- γ , l'IL-4, l'IL12, l'IL-18, l'IL-21 ou une combinaison d'IL-12 et d'IL-18 n'ont induit, quant à eux, aucun effet notable sur l'expression du récepteur Ly49E par les cellules NK. Rappelons que le récepteur Ly49E apparaît précocement sur les cellules NK fœtales et qu'il disparaît dès la naissance (Van Beneden *et al*, 2001). Dans le cas du récepteur Ly49G, la présence d'IL-2 dans le milieu de culture entraîne une augmentation de la proportion de cellules NK Ly49G⁺, mais cette augmentation ne se fait pas progressivement contrairement au récepteur Ly49E. Toujours en présence d'IL-2, la proportion de cellules T NK1.1⁺ qui expriment les récepteurs Ly49A, Ly49F et Ly49G augmente, mais cet effet diminue progressivement avec le temps de culture. L'addition

dans le milieu de culture d'IL-2 et d'IL-4 ou d'IL-21 entraîne des effets variables selon les récepteurs concernés et selon le type de cellules (cellules NK NK1.1⁺ CD3⁻ ou cellules T CD3⁺) comparativement à la présence d'IL-2 uniquement. Par exemple, la présence combinée d'IL-2 et d'IL-4 dans le milieu de culture des cellules NK NK1.1⁺ CD3⁻ induit une diminution d'environ 50% de la proportion de cellules qui expriment le récepteur Ly49G. L'IL-21 combinée à l'IL-2 induit une diminution d'environ 80% de la proportion de cellules T et NK qui expriment le récepteur Ly49F, mais elle augmente considérablement la proportion des cellules NK Ly49E⁺ et très fortement celles des cellules T Ly49E⁺ (Gays *et al*, 2005). Ainsi deux différentes équipes ont démontré que l'expression des récepteurs Ly49 pouvait être modulée par l'action de diverses cytokines. Cette fluctuation dépend cependant des types de cellules lymphoïdes observés (cellules NK ou lymphocytes T) et il s'agirait d'une variation de la taille des populations de cellules qui expriment ces récepteurs plutôt que d'une modulation du niveau d'expression de ces derniers.

Deux équipes différentes ont rapporté récemment la présence du récepteur Ly49Q sur les cellules dendritiques d'origine plasmacytoïde (pDC) et myéloïdes (mDC) (Kamogawa-Schifter *et al*, 2005; Toyama-Sorimachi *et al*, 2005). Le récepteur Ly49Q n'a pas été détecté sur les cellules NK ou NKT, mais sa présence a été observée sur les cellules Gr1⁺ du foie fœtal, de la rate et de la moelle osseuse de même que sur les macrophages activés (Toyama-Sorimachi *et al*, 2004). Sur les cellules dendritiques, le niveau d'expression du récepteur Ly49Q dépend à la fois des cytokines présentes dans leur environnement, du type des cellules dendritiques et du niveau de maturation de ces cellules. L'expression du récepteur Ly49Q sur ces cellules débute dans la moelle, puis, à mesure que les cellules migrent en périphérie et se différencie, le niveau d'expression du récepteur semble diminuer durant la maturation des cellules dendritiques. Il est ainsi fortement exprimé par les cellules pré-pDC et plus faiblement par les cellules pDC et mDC (Kamogawa-Schifter *et al*, 2005; Toyama-Sorimachi *et al*, 2005; Toma-Hirano *et al.*, 2007). De même, les cellules myéloïdes immatures GR1.1⁺, qui incluent les cellules monocytes immatures, expriment de grande quantité de récepteur Ly49Q, mais cette expression est atténuée sur les monocytes circulants. Toutefois, le niveau d'expression du

récepteur Ly49Q peut-être augmenté sur les cellules dendritiques d'origine myéloïde matures et les macrophages en présence d'IFN- α ou d'IFN- γ dans le milieu. Ces observations corroborent nos propres résultats car le niveau d'expression du récepteur Ly49B diminue en effet avec le nombre de passage des cellules RAW 264.7 et il peut être augmenté lorsque les macrophages sont activés.

Pendant la période durant laquelle nos expérimentations étaient effectuées, la même équipe qui avait étudié la modulation des récepteurs Ly49 par des cytokines (Gays *et al*, 2005) a rapporté la présence du récepteur Ly49B sur les macrophages (Gays *et al*, 2006) confirmant ainsi les observations de notre équipe (Perrée 2003 et les résultats de ce mémoire). À l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur Ly49B (1A1), Gays et collaborateurs ont détecté ce récepteur sur des macrophages dérivés de la rate ou de la moelle osseuse et sur des macrophages péritonéaux récoltés après injection de thioglycollate. Cette équipe rapporte également l'expression du récepteur Ly49B^{B6} sur certaines populations de cellules dendritiques. Il serait intéressant de vérifier l'expression du récepteur Ly49B^{BALB/c} sur ces cellules car il se pourrait que le récepteur Ly49B et le récepteur Ly49Q assurent des fonctions similaires sur les cellules du système immunitaires d'origine myéloïde, comme dans le processus de maturation de ces cellules tel que mentionné précédemment.

On peut toutefois observer des différences dans les voies d'activation qui induisent l'expression des récepteurs Ly49B et Ly49Q à la surface des cellules dendritiques et des macrophages. Par exemple, Toyama–Sorimachi et son équipe ont détecté une augmentation du niveau d'expression du récepteur Ly49Q à la surface des cellules dendritiques d'origine myéloïdes en présence d'IFN- γ et d'IFN- α mais pas (ou peu) en présence d'agonistes spécifiques des TLRs comme le LPS (Toyama-Sorimachi *et al*, 2005). Gays et collaborateurs ont rapporté que le niveau d'expression du récepteur Ly49B^{B6} est également augmenté sur les cellules dendritiques et plus faiblement sur les macrophages dérivés de la rate, en présence d'IFN- α et d'IFN- γ . Sur les macrophages dérivés de la moelle osseuse, outre ces deux cytokines, le LPS induit également une augmentation du niveau d'expression du récepteur Ly49B. Hormis pour l'IFN- α , ces

résultats confirment nos observations. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les récepteurs Ly49B et Ly49Q, exprimés sur des cellules d'origine myéloïde, sont tous deux modulés en présence d'IFN de type I et de type II alors que ces mêmes cytokines ne modulent pas le niveau d'expression des récepteurs Ly49 à la surface des cellules NK ou T NK1.1⁺ qui ont pourtant des récepteurs appropriés à leur surface (Toyama-Sorimachi *et al*, 2004; Gays *et al*, 2005; Toyama-Sorimachi *et al*, 2005). Il semble donc que deux types cellulaires d'origine myéloïde expriment toutes deux à la hausse les récepteurs Ly49Q et Ly49B dans des conditions similaires d'activation. Or, il s'agit dans les deux cas de cellules dont les fonctions sont étroitement liées à la modulation du cytosquelette par exemple lors de la phagocytose ou de la migration cellulaire. Il serait donc possible que les récepteurs Ly49B et Ly49Q soient impliqués dans ces phénomènes.

Un argument en faveur de cette hypothèse est le rôle présumé que joue le récepteur Ly49Q sur les cellules GR1⁺ de la lignée myéloïde. Il serait en effet associé à la régulation et au réarrangement du cytosquelette de ces cellules (Toyama-Sorimachi *et al*, 2004). Nous n'avons pas observé d'effet sur le cytosquelette des cellules RAW 264.7 lors de l'ajout de notre anticorps ni d'expression localisée du récepteur Ly49B au niveau des prolongements cytoplasmiques de ces cellules par microscopie confocale. Cela n'exclut pas néanmoins son implication éventuelle dans la migration cellulaire ou la phagocytose. L'effet des récepteurs Ly49 sur la migration cellulaire pourrait s'effectuer de manière directe, comme dans le cas du récepteur Ly49Q sur les cellules RAW 264.7 (Toyama-Sorimachi *et al*, 2004) ou indirectement comme il semble que ce soit le cas avec les lymphocytes B. Une équipe a en effet rapporté la présence différentielle du récepteur activateur Ly49D et du récepteur inhibiteur Ly49G2 sur des lymphocytes B de souris B6, à un certain stade de leur différenciation (Hart *et al.*, 2003; Hart *et al*, 2005). Le récepteur activateur Ly49D a été décelé sur les lymphocytes B immatures, mais non sur les stades précédents de ce lignage et son expression semble diminuer avec la maturation subséquente des cellules (Hart *et al*, 2003). L'activation de ce récepteur par un anticorps agoniste induit la production d'IFN- γ par les lymphocytes B immatures. Au cours de la différenciation, cette cytokine favorise la migration de ces cellules de la moelle osseuse vers la rate où se complète leur différenciation. Celle-ci s'accompagne d'une diminution

de l'expression du récepteur Ly49D. Les lymphocytes B matures pourront ensuite migrer vers les ganglions lymphatiques et les sites d'infection ou d'inflammation. Les auteurs font l'hypothèse que durant la migration des lymphocytes B immatures de la souris B6 de la moelle osseuse vers la rate, l'interaction de Ly49D avec H-2D^b maintiendrait une production constante d'IFN- γ dans leur microenvironnement, ce qui empêcherait le réarrangement du cytosquelette de la cellule et donc sa migration précoce vers les ganglions lymphatiques ou les sites inflammatoires. Dans une étude subséquente, la même équipe attribue au récepteur Ly49G2, qui serait fortement exprimé sur les lymphocytes B immatures, la régulation de ce processus. L'engagement du récepteur Ly49G2 avec un CMH de classe I, lui servant de ligand, permettrait de réguler la capacité de ces cellules à sécréter de l'IFN- γ en réponse à l'engagement du récepteur Ly49D. Le rôle du récepteur Ly49G2 serait donc d'empêcher une exportation précoce de ces cellules. Fait intéressant à noter, la diminution de l'expression du récepteur Ly49G2 et l'augmentation parallèle du récepteur d'activation Ly49D précéderait la sortie des lymphocytes B immatures de la moelle osseuse. Dans une étude plus récente, les auteurs font état de la participation de l'IL-12 et de l'IL-18 au phénomène rapporté (Hart, Flaishon et Shachar 2007). Si intéressantes que soient ces hypothèses, elles nécessitent confirmation par d'autres équipes. Exception faite d'une unique publication ayant rapporté la présence de récepteurs Ly49 sur des lymphocytes péritonéaux B-1 (Ochi *et al.*, 2006), Hart et collaborateurs sont en effet les seuls à avoir rapporté la présence de récepteurs Ly49 sur des lymphocytes B. D'autre part, ils sont également les seuls à présumer de l'engagement des récepteurs Ly49D et Ly49G2 avec H-2D^b. Leurs observations doivent donc pour l'instant être considérées avec réserve. Par ailleurs, les résultats rapportés par Ochi et Watanabe supportaient l'hypothèse que des récepteurs Ly49 inhibiteurs puissent atténuer l'arrêt de croissance et l'apoptose des cellules B-1 activées via le BCR (Ochi et Watanabe 2000). Il n'y a cependant jamais eu confirmation de cette observation.

Les travaux effectués par l'équipe de Gays quant au récepteur Ly49B ont été effectués sur des souris B6. L'anticorps 1A1 produit et utilisé par ce groupe détecte uniquement l'allèle B6 du récepteur Ly49B alors que l'anticorps 3LP218 produit dans

notre laboratoire est spécifique d'un allèle exprimé notamment chez BALB/c (dont sont issues les cellules RAW 264.7), DBA/2 et C3H. Quelques rares polymorphismes ayant été détectés dans le gène *Ly49b* (revue par Lévesque, 2002), il est intéressant que la spécificité des anticorps anti-Ly49B cible précisément des séquences où se situent ces polymorphismes. Ceux-ci sont sans doute présents dans des séquences correspondant aux régions de la protéine qui sont les plus accessibles. À l'instar du récepteur Ly49B^{BALB/c}, le récepteur Ly49B^{B6} est capable de s'associer à la protéine SHP-1 et il pourrait également fixer la protéine SHP-2 (Perrée 2003; Gays *et al.*, 2006). Il semble donc que les deux allèles du récepteur Ly49B soient fonctionnels. En accord avec les observations de notre laboratoire, Gays *et al.*, ne détectent pas le récepteur Ly49B ni sur les lymphocytes T et B ni sur les cellules NK et NKT de la rate. Ils ne le détectent pas non plus sur les cellules NK ou NKT après culture des cellules spléniques durant 7 jours en présence d'IL-2. Par contre, le récepteur Ly49B apparaît, à un niveau faible mais constant, à la surface des cellules NK, mais non des NKT lorsque le milieu de culture contient de l'IL-12 et de l'IL-18 en plus de l'IL-2. D'autres auteurs ont déjà suspecté la présence du récepteur Ly49B sur des cellules NK. La présence d'ARNm codant pour ce récepteur a été détecté dans des cellules NK fœtales issues d'embryons âgés de 14 jours (Lian *et al.*, 2002). Cette même équipe avait également détecté de l'ARNm codant pour le récepteur Ly49B dans des précurseurs de cellules NK isolés de la moelle osseuse et cultivés pendant 5 jours en présence d'un mélange de cytokines IL-7, SCF et Flt3L (Williams *et al.*, 2000). Cependant, l'absence d'anticorps dirigés contre le récepteur Ly49B n'a pas permis de vérifier à l'époque l'expression des récepteurs Ly49B à la surface de ces cellules.

Seulement deux études ont rapporté la recherche systématique de ligands pour le récepteur Ly49B. Dès 1999, Hanke et collaborateurs avaient d'abord transfecté des cellules COS-7 avec les séquences codantes des gènes de différents récepteurs Ly49 dont Ly49B (Hanke *et al.*, 1999). Comme aucun anticorps capable de reconnaître ce récepteur de manière spécifique n'avait été rapporté à cette époque, cette équipe a ajouté une séquence hémagglutinine (HA) à l'extrémité C-terminale du gène *Ly49b* de façon à pouvoir utiliser un anticorps anti-HA pour vérifier l'expression de la protéine sur les transfectants. Malgré la confirmation de l'expression du récepteur Ly49B sur les transfectants, ceux-ci n'ont été capables de lier aucune des molécules du CMH de classe I étudiées, que celles-ci soient utilisées sous la forme de tétramères peptide/CMH-I (H-2K^b,

H-2K^d, H-2D^b, H-2D^k ou H-2D^d) ou présentes à la surface de lymphoblastes de souris B10 congéniques ou recombinantes pour le CMH. Il est toutefois possible que la séquence peptidique HA ajoutée au récepteur Ly49B ait empêché la liaison du récepteur avec son ligand. L'équipe de Scarpellino utilise notamment cet argument pour tenter d'expliquer que leurs propres résultats soient si différents (Scarpellino et al., 2007). Ce groupe identifie un grand nombre de ligands pour le récepteur Ly49B^{B6} parmi les CMH de classe I. Dans cette étude, des cellules HEK-293T ont été transfectées avec des plasmides contenant les gènes codant pour différents récepteurs Ly49 dont le récepteur Ly49B^{B6}. L'expression du récepteur Ly49B^{B6} a été vérifiée à l'aide d'anticorps polyclonaux de rats immunisés avec une forme soluble de la portion extracellulaire du récepteur Ly49B. Tout comme Hanke et collaborateurs, l'équipe de Scarpellino a recherché des ligands éventuels du récepteur Ly49B à l'aide de multimères peptide/CMH-I. Selon leurs résultats, le récepteur Ly49B^{B6} serait capable de se lier aux CMH-I de type H-2K^b, H-2K^d, H-2D^b, H-2D^k et H-2D^d. Néanmoins, cette reconnaissance ne s'effectuerait qu'en conformation *trans* contrairement aux récepteurs Ly49A, Ly49C, Ly49I et Ly49Q témoignant une fois de plus de la singularité du récepteur Ly49B. Malgré des protocoles relativement similaires, sauf en ce qui a trait à l'origine humaine ou murine de la β 2-microglobuline utilisée pour la constitution des tétramères, à l'ajout d'une étiquette HA ou à l'utilisation d'un sérum polyclonal pour la détection de l'expression du récepteur Ly49B, les résultats obtenus par ces deux équipes sont totalement opposés. Maintenant que des anticorps monoclonaux anti-Ly49B sont disponibles, que la distribution cellulaire du récepteur Ly49 a été caractérisée et que sa modulation par différents agonistes ou cytokines a été établie, il sera possible de reprendre les études de liaisons à des tétramères peptide/CMH-I dans des conditions différentes. La nature du ou des ligand(s) du récepteur Ly49B est pour l'instant encore un sujet à controverse, mais compte tenu de sa singularité structurale, il est tout à fait possible qu'il s'agisse d'une molécule distincte des ligands des autres récepteurs Ly49, voire même une molécule d'origine exogène.

Le gène *Ly49b* possède des caractéristiques communes avec le gène *Ly49h* notamment dans sa région promotrice (Wilhelm *et al*, 2001). Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont rapporté la modulation de certains récepteurs Ly49 en condition d'infection virale par le MCMV (Depatie *et al*, 1999; Tay *et al.*, 1999) ou parasitaire avec *Litomosoides sigmodontis* (Korten *et al.*, 2002) et l'implication du récepteur Ly49H dans l'élimination du virus MCMV a déjà été démontrée (voir chapitre 2.4.2 de la section revue de littérature). Considérant le potentiel inhibiteur du récepteur Ly49B, son expression dans des cellules qui interviennent dans l'immunité innée et acquise contre les agents pathogènes et sa modulation dans des conditions particulières d'activation ainsi qu'il a été établi dans le présent mémoire, il serait tout à fait possible que le récepteur Ly49B soit capable de reconnaître une ou des molécule(s) exogène(s) et qu'il participe à leur tolérance. On s'attend à ce que l'expression en surface cellulaire d'un récepteur potentiellement inhibiteur ne soit pas fortuite, mais son rôle dans la tolérance ou dans la régulation d'une réponse inflammatoire reste à explorer.

VI - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire, ont permis de préciser le cadre de régulation de l'expression du récepteur Ly49B à la surface d'une lignée de macrophages activés, la lignée RAW 264.7, et d'établir que celle-ci n'est surtout pas fortuite. Le récepteur Ly49B apparaît en effet à la membrane cytoplasmique dans des conditions précises d'activation cellulaire. Les interférons de type I et II y jouent respectivement un rôle majeur, soit à titre de médiateur intermédiaire (IFN- β) suite à l'activation via des TLRs, soit à titre d'inducteur le plus efficace (IFN- γ). Le récepteur Ly49B étant vingt fois plus abondant sur les cellules activées en conditions optimales avec de l'IFN- γ , il est logique de faire l'hypothèse qu'il doit y jouer un rôle régulateur, à condition cependant de pouvoir entrer en contact avec un ligand. Les résultats rapportés récemment par une autre équipe en ce qui a trait à la capacité du récepteur Ly49B de se lier à plusieurs complexes peptide/CMH-I suggèrent qu'à ce titre il ne se distingue pas des autres récepteurs Ly49. Cependant, ces observations devront être confirmées dans un contexte d'interactions cellule/cellule. L'anticorps monoclonal 3LP218, pour lequel nous n'avons pas pu démontrer de propriétés agonistes, demeure un outil prometteur puisqu'il pourrait être utilisé comme bloqueur dans ce type d'interactions. Le recrutement du récepteur Ly49B à la membrane étant perceptible à des doses infimes d'agonistes et l'intervention de différentes cytokines à action autocrine ayant été démontrée (IFN- β) ou étant suspectée (TNF- α , IL-4, IL-10), il s'agit vraisemblablement d'une réponse finement contrôlée. Ce phénomène particulier est peut-être la raison de l'absence de liaison *in cis* du récepteur Ly49B à ses ligands, un autre mécanisme de contrôle d'expression qui semble opérationnel pour la majorité des autres récepteurs de la famille Ly49.

Bien que l'intégrité du gène *Ly49b* se soit maintenue au cours de l'évolution alors que la majorité des autres gènes *Ly49* ont subi d'importantes transformations, la régulation de l'expression du récepteur Ly49B dans des conditions sélectives d'activation discrédite l'hypothèse que ce gène puisse n'être qu'un vestige dénué d'intérêt. Sa conservation comme celle de son orthologue chez le rat pourrait au contraire signifier que les produits de l'un et l'autre sont essentiels à la maturation et au fonctionnement des cellules myéloïdes.

En fonction du contrôle sélectif de son expression dans différentes conditions d'activation, le récepteur Ly49B continue donc de faire « bande à part » relativement aux autres membres de la famille Ly49B. Il sera capital de valider, dans des conditions plus physiologiques, la modulation de l'expression du récepteur Ly49B sur les macrophages et les polynucléaires neutrophiles et peut-être sur d'autres cellules de la lignée myéloïde, de confirmer la liaison de ce récepteur à des molécules du CMH de classe I exprimées en *trans*, mais également de poursuivre la recherche des fonctions qui pourraient être régulées lors de l'engagement de ce récepteur qui reste encore bien insolite.

VII - RÉFÉRENCES

- Adams, E. J., Juo, Z. S., Venook, R. T., Boulanger, M. J., Arase, H., Lanier, L. L. et Garcia, K. C. (2007). "Structural elucidation of the m157 mouse cytomegalovirus ligand for Ly49 natural killer cell receptors." Proc Natl Acad Sci U S A 104(24):10128-33
- Akira, S., Uematsu, S. et Takeuchi, O. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell 124(4): 783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. et Flavell, R. A. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature 413(6857): 732-8.
- 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.
- Anderson, S. K., Dewar, K., Goulet, M. L., Leveque, G. et Makrigiannis, A. P. (2005). "Complete elucidation of a minimal class I MHC natural killer cell receptor haplotype." Genes Immun 6(6): 481-92.
- Andrade, R. M., Portillo, J. A., Wessendarp, M. et Subauste, C. S. (2005). "CD40 signaling in macrophages induces activity against an intracellular pathogen independently of gamma interferon and reactive nitrogen intermediates." Infect Immun 73(5): 3115-23.
- 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 296(5571): 1323-6.
- 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(12): 1957-63.
- Austyn, J. M. et Gordon, S. (1981). "F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage." Eur J Immunol 11(10): 805-15.
- Becker, S. et Daniel, E. G. (1990). "Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production." Cell Immunol 129(2): 351-62.
- Bennett, M. (1987). "Biology and genetics of hybrid resistance." Adv Immunol 41: 333-445.

- Bennett, M., Yu, Y. Y., Stoneman, E., Rembecki, R. M., Mathew, P. A., Lindahl, K. F. et Kumar, V. (1995). "Hybrid resistance: 'negative' and 'positive' signaling of murine natural killer cells." Semin Immunol 7(2): 121-7.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., Mathison, J., Ulevitch, R. et Cerami, A. (1985). "Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin." Nature 316(6028): 552-4.
- Birch, J. et Ellis, S. A. (2007). "Complexity in the cattle CD94/NKG2 gene families." Immunogenetics 59(4): 273-80.
- Bonjardim, C. A. (2005). "Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action." Microbes Infect 7(3): 569-78.
- Boonstra, A., Rajsbaum, R., Holman, M., Marques, R., Asselin-Paturel, C., Pereira, J. P., Bates, E. E., Akira, S., Vieira, P., Liu, Y. J., Trinchieri, G. et O'Garra, A. (2006). "Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals." J Immunol 177(11): 7551-8.
- Bosca, L., Zeini, M., Traves, P. G. et Hortelano, S. (2005). "Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate." Toxicology 208(2): 249-58.
- 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(6): 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(17): 9691-4.
- Broad, A., Kirby, J. A. et Jones, D. E. (2007). "Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon-beta production." Immunology 120(1): 103-11.
- Brown, M. G., Fulmek, S., Matsumoto, K., Cho, R., Lyons, P. A., Levy, E. R., Scalzo, A. A. et Yokoyama, W. M. (1997). "A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6." Genomics 42(1): 16-25.
- 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(4): 1991-9.
- Bubic, I., Wagner, M., Krmpotic, A., Saulig, T., Kim, S., Yokoyama, W. M., Jonjic, S. et Koszinowski, U. H. (2004). "Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus." J Virol 78(14): 7536-44.

- Cai, G., Kastelein, R. A. et Hunter, C. A. (1999). "IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18." Eur J Immunol 29(9): 2658-65.
- 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(10): 5917-23.
- Carlyle, J. R., Jamieson, A. M., Gasser, S., Clingan, C. S., Arase, H. et Raulet, D. H. (2004). "Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors." Proc Natl Acad Sci U S A 101(10): 3527-32.
- Cella, M., Nakajima, H., Facchetti, F., Hoffmann, T. et Colonna, M. (2000). "ILT receptors at the interface between lymphoid and myeloid cells." Curr Top Microbiol Immunol 251: 161-6.
- Chalifour, A., Roger, J., Lemieux, S. et Duplay, P. (2003). "Receptor/ligand avidity determines the capacity of Ly49 inhibitory receptors to interfere with T-cell receptor-mediated activation." Immunology 109(1): 58-67.
- Chan, P. Y. et Takei, F. (1988). "Characterization of a murine T cell surface disulfide-linked dimer of 45-kDa glycopeptides (YE1/48 antigen). Comparison with T cell receptor, purification, and partial amino acid sequences." J Immunol 140(1): 161-9.
- Chan, P. Y. et Takei, F. (1989). "Molecular cloning and characterization of a novel murine T cell surface antigen, YE1/48." J Immunol 142(5): 1727-36.
- Chen, C. W., Chang, Y. H., Tsi, C. J. et Lin, W. W. (2003). "Inhibition of IFN-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase induction by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2, involves inhibition of the upstream Janus kinase/STAT1 signaling pathway." J Immunol 171(2): 979-88.
- Chen, G. et Goeddel, D. V. (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science 296(5573): 1634-5.
- Chesrown, S. E., Monnier, J., Visner, G. et Nick, H. S. (1994). "Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF-gamma, TGF-beta, and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages." Biochem Biophys Res Commun 200(1): 126-34.
- Clarke, C. J., Hales, A., Hunt, A. et Foxwell, B. M. (1998). "IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity." Eur J Immunol 28(5): 1719-26.

- 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(1): 236-44.
- Colonna, M. (2007). "TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own." Eur J Immunol 37(2): 306-9.
- Conti, P., Kempuraj, D., Kandere, K., Di Gioacchino, M., Barbacane, R. C., Castellani, M. L., Felaco, M., Boucher, W., Letourneau, R. et Theoharides, T. C. (2003). "IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always." Immunol Lett 86(2): 123-9.
- Cox, E. A. et Huttenlocher, A. (1998). "Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration." Microsc Res Tech 43(5): 412-9.
- Croy, B. A., Esadeg, S., Chantakru, S., van den Heuvel, M., Paffaro, V. A., He, H., Black, G. P., Ashkar, A. A., Kiso, Y. et Zhang, J. (2003). "Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus." J Reprod Immunol 59(2): 175-91.
- Cudkowicz, G. et Stimpfling, J. H. (1964). "Hybrid Resistance to Parental Marrow Grafts: Association with the K Region of H-2." Science 144: 1339-40.
- Dalpke, A., Frank, J., Peter, M. et Heeg, K. (2006). "Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species." Infect Immun 74(2): 940-6.
- Dam, J., Baber, J., Grishaev, A., Malchiodi, E. L., Schuck, P., Bax, A. et Mariuzza, R. A. (2006). "Variable dimerization of the Ly49A natural killer cell receptor results in differential engagement of its MHC class I ligand." J Mol Biol 362(1): 102-13.
- Dello Sbarba, P., Rovida, E., Caciagli, B., Nencioni, L., Labardi, D., Paccagnini, A., Savini, L. et Cipolleschi, M. G. (1996). "Interleukin-4 rapidly down-modulates the macrophage colony-stimulating factor receptor in murine macrophages." J Leukoc Biol 60(5): 644-50.
- 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(9): 1541-51.
- Derbigny, W. A., Kerr, M. S. et Johnson, R. M. (2005). "Pattern recognition molecules activated by Chlamydia muridarum infection of cloned murine oviduct epithelial cell lines." J Immunol 175(9): 6065-75.
- Dermine, J. F., Duclos, S., Garin, J., St-Louis, F., Rea, S., Parton, R. G. et Desjardins, M. (2001). "Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes." J Biol Chem 276(21): 18507-12.

- Desrosiers, M. P., Kielczewska, A., Loredó-Osti, J. C., Adam, S. G., Makrigiannis, A. P., Lemieux, S., Pham, T., Lodoen, M. B., Morgan, K., Lanier, L. L. et Vidal, S. M. (2005). "Epistasis between mouse Klra and major histocompatibility complex class I loci is associated with a new mechanism of natural killer cell-mediated innate resistance to cytomegalovirus infection." Nat Genet 37(6): 593-9.
- Ding, A. H., Sanchez, E., Srimal, S. et Nathan, C. F. (1989). "Macrophages rapidly internalize their tumor necrosis factor receptors in response to bacterial lipopolysaccharide." J Biol Chem 264(7): 3924-9.
- Djaldetti, M., Salman, H., Bergman, M., Djaldetti, R. et Bessler, H. (2002). "Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors." Microsc Res Tech 57(6): 421-31.
- Dobromylskyj, M. et Ellis, S. (2007). "Complexity in cattle KIR genes: transcription and genome analysis." Immunogenetics 59(6): 463-72.
- Dobrovolskaia, M. A. et Vogel, S. N. (2002). "Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS." Microbes Infect 4(9): 903-14.
- Dokun, A. O., Kim, S., Smith, H. R., Kang, H. S., Chu, D. T. et Yokoyama, W. M. (2001). "Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection." Nat Immunol 2(10): 951-6.
- Dorfman, J. R. et Raulet, D. H. (1998). "Acquisition of Ly49 receptor expression by developing natural killer cells." J Exp Med 187(4): 609-18.
- Doucey, M. A., Scarpellino, L., Zimmer, J., Guillaume, P., Luescher, I. F., Bron, C. et Held, W. (2004). "Cis association of Ly49A with MHC class I restricts natural killer cell inhibition." Nat Immunol 5(3): 328-36.
- Duffield, J. S. (2003). "The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde." Clin Sci (Lond) 104(1): 27-38.
- 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(11): 6585-92.
- Fanger, N. A., Borges, L. et Cosman, D. (1999). "The leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIRs): a new family of immune regulators." J Leukoc Biol 66(2): 231-6.
- Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S. et Raulet, D. H. (2005). "A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules." Blood 105(11): 4416-23.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. et O'Garra, A. (1991). "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." J Immunol 147(11): 3815-22.

- Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H. et Ikeda, H. (2003). "Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex." Pharmacol Ther 100(2): 171-94.
- Gagnier, L., Wilhelm, B. T. et Mager, D. L. (2003). "Ly49 genes in non-rodent mammals." Immunogenetics 55(2): 109-15.
- Gays, F., Martin, K., Kenefeck, R., Aust, J. G. et Brooks, C. G. (2005). "Multiple cytokines regulate the NK gene complex-encoded receptor repertoire of mature NK cells and T cells." J Immunol 175(5): 2938-47.
- Gays, F., Aust, J. G., Reid, D. M., Falconer, J., Toyama-Sorimachi, N., Taylor, P. R. et Brooks, C. G. (2006). "Ly49B is expressed on multiple subpopulations of myeloid cells." J Immunol 177(9): 5840-51.
- Goerdts, S. et Orfanos, C. E. (1999). "Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells." Immunity 10(2): 137-42.
- Golab, J., Zagozdzon, Stoklosa, T., Kaminski, R., Kozar, K. et Jakobisiak, M. (2000). "Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far?" Immunol Lett 72(3): 153-7.
- Gordon, S., Lawson, L., Rabinowitz, S., Crocker, P. R., Morris, L. et Perry, V. H. (1992). "Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues." Curr Top Microbiol Immunol 181: 1-37.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol 3(1): 23-35.
- Gordon, S. et Taylor, P. R. (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol 5(12): 953-64.
- 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(4): 533-40.
- Grohmann, U., Belladonna, M. L., Vacca, C., Bianchi, R., Fallarino, F., Orabona, C., Fioretti, M. C. et Puccetti, P. (2001). "Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-gamma." J Immunol 167(1): 221-7.
- Guethlein, L. A., Flodin, L. R., Adams, E. J. et Parham, P. (2002). "NK cell receptors of the orangutan (*Pongo pygmaeus*): a pivotal species for tracking the coevolution of killer cell Ig-like receptors with MHC-C." J Immunol 169(1): 220-9.
- 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(1): 67-77.
- Hao, L. et Nei, M. (2004). "Genomic organization and evolutionary analysis of Ly49 genes encoding the rodent natural killer cell receptors: rapid evolution by repeated gene duplication." Immunogenetics 56(5): 343-54.
- Hardin, A. O., Meals, E. A., Yi, T., Knapp, K. M. et English, B. K. (2006). "SHP-1 inhibits LPS-mediated TNF and iNOS production in murine macrophages." Biochem Biophys Res Commun 342(2): 547-55.
- Hart, G., Flaishon, L., Becker-Herman, S. et Shachar, I. (2003). "Ly49D receptor expressed on immature B cells regulates their IFN-gamma secretion, actin polymerization, and homing." J Immunol 171(9): 4630-8.
- Hart, G., Flaishon, L., Becker-Herman, S. et Shachar, I. (2005). "Tight regulation of IFN-gamma transcription and secretion in immature and mature B cells by the inhibitory MHC class I receptor, Ly49G2." J Immunol 175(8): 5034-42.
- Hart, G., Flaishon, L. et Shachar, I. (2007). "IL-12 and IL-18 down-regulate B cell migration in an Ly49D-dependent manner." Eur J Immunol 37(7): 1996-2007.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. et Aderem, A. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature 410(6832): 1099-103.
- Held, T. K., Weihua, X., Yuan, L., Kalvakolanu, D. V. et Cross, A. S. (1999). "Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1." Infect Immun 67(1): 206-12.
- Hertzog, P. J., O'Neill, L. A. et Hamilton, J. A. (2003). "The interferon in TLR signaling: more than just antiviral." Trends Immunol 24(10): 534-9.
- Hodge-Dufour, J., Marino, M. W., Horton, M. R., Jungbluth, A., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Noble, P. W., Hunter, C. A. et Pure, E. (1998). "Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A 95(23): 13806-11.
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahring, U. et Beutler, B. (2005). "CD36 is a sensor of diacylglycerides." Nature 433(7025): 523-7.
- Hoelsbrekken, S. E., Nylenna, O., Saether, P. C., Slettedal, I. O., Ryan, J. C., Fossum, S. et Dissen, E. (2003). "Cutting edge: molecular cloning of a killer cell Ig-like receptor in the mouse and rat." J Immunol 170(5): 2259-63.

Hunt, A. E., Williams, L. M., Lali, F. V. et Foxwell, B. M. (2002). "IL-4 regulation of p38 MAPK signalling is dependent on cell type." Cytokine 18(6): 295-303.

Iizuka, K., Naidenko, O. V., Plougastel, B. F., Fremont, D. H. et Yokoyama, W. M. (2003). "Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKR1 family of natural killer cell receptors." Nat Immunol 4(8): 801-7.

Iizuka, K., Nakajima, C., Iizuka, Y. M., Takase, M., Kato, T., Noda, S., Tanaka, K. et Kanagawa, O. (2007). "Protection from lethal infection by adoptive transfer of CD8 T cells genetically engineered to express virus-specific innate immune receptor." J Immunol 179(2): 1122-8.

Iles, K. E. et Forman, H. J. (2002). "Macrophage signaling and respiratory burst." Immunol Res 26(1-3): 95-105.

Inngjerdingen, M., Rolstad, B. et Ryan, J. C. (2003). "Activating and inhibitory Ly49 receptors modulate NK cell chemotaxis to CXC chemokine ligand (CXCL) 10 and CXCL12." J Immunol 171(6): 2889-95.

Isaacs, A. et Lindenmann, J. (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci 147(927): 258-67.

Isaacs, A., Lindenmann, J. et Valentine, R. C. (1957). "Virus interference. II. Some properties of interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci 147(927): 268-73.

Ishii, R., Horie, M., Koyama, K., Ishikawa, Y. et Kitanaka, S. (2005). "Inhibitory effects of fungal bis(naphtho-gamma-pyrone) derivatives on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon-gamma." Biol Pharm Bull 28(5): 786-90.

Jacobs, A. T. et Ignarro, L. J. (2001). "Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages." J Biol Chem 276(51): 47950-7.

Jana, M., Liu, X., Koka, S., Ghosh, S., Petro, T. M. et Pahan, K. (2001). "Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells." J Biol Chem 276(48): 44527-33.

Jiang, W. et Pisetsky, D. S. (2006). "The role of IFN-alpha and nitric oxide in the release of HMGB1 by RAW 264.7 cells stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid or lipopolysaccharide." J Immunol 177(5): 3337-43.

Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Galanos, C., Freudenberg, M. et Beutler, B. (2005). "CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling." Nat Immunol 6(6): 565-70.

Johansson, S., Johansson, M., Rosmaraki, E., Vahlne, G., Mehr, R., Salmon-Divon, M., Lemonnier, F., Karre, K. et Hoglund, P. (2005). "Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules." J Exp Med 201(7): 1145-55.

Johnson, M. E., Viggiano, L., Bailey, J. A., Abdul-Rauf, M., Goodwin, G., Rocchi, M. et Eichler, E. E. (2001). "Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes." Nature 413(6855): 514-9.

Jones, B. W., Means, T. K., Heldwein, K. A., Keen, M. A., Hill, P. J., Belisle, J. T. et Fenton, M. J. (2001). "Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses." J Leukoc Biol 69(6): 1036-44.

Jozefowski, S., Arredouani, M., Sulahian, T. et Kobzik, L. (2005). "Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO." J Immunol 175(12): 8032-41.

Kaisho, T. et Akira, S. (2006). "Toll-like receptor function and signaling." J Allergy Clin Immunol 117(5): 979-87; quiz 988.

Kamogawa-Schifter, Y., Ohkawa, J., Namiki, S., Arai, N., Arai, K. et Liu, Y. (2005). "Ly49Q defines 2 pDC subsets in mice." Blood 105(7): 2787-92.

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

Kane, K. P., Lavender, K. J. et Ma, B. J. (2004). "Ly-49 receptors and their functions." Crit Rev Immunol 24(5): 321-48.

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(10): 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(6381): 66-70.

Karre, K. (1991). "MHC gene control of the natural killer system at the level of the target and the host." Semin Cancer Biol 2(5): 295-309.

Kawai, T. et Akira, S. (2007). "TLR signaling." Semin Immunol 19(1): 24-32.

Kim, S. et Yokoyama, W. M. (1998). "NK cell granule exocytosis and cytokine production inhibited by Ly-49A engagement." Cell Immunol 183(2): 106-12.

Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y. J., Yang, L., French, A. R., Sunwoo, J. B., Lemieux, S., Hansen, T. H. et Yokoyama, W. M. (2005).

"Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules." Nature 436(7051): 709-13.

Kim, Y. M. et Son, K. (1996). "A nitric oxide production bioassay for interferon-gamma." J Immunol Methods 198(2): 203-9.

Korten, S., Volkmann, L., Saefel, M., Fischer, K., Taniguchi, M., Fleischer, B. et Hoerauf, A. (2002). "Expansion of NK cells with reduction of their inhibitory Ly-49A, Ly-49C, and Ly-49G2 receptor-expressing subsets in a murine helminth infection: contribution to parasite control." J Immunol 168(10): 5199-206.

Kota, R. S., Rutledge, J. C., Gohil, K., Kumar, A., Enelow, R. I. et Ramana, C. V. (2006). "Regulation of gene expression in RAW 264.7 macrophage cell line by interferon-gamma." Biochem Biophys Res Commun 342(4): 1137-46.

Krieg, A. M. (2000). "The role of CpG motifs in innate immunity." Curr Opin Immunol 12(1): 35-43.

Kubota, A., Kubota, S., Lohwasser, S., Mager, D. L. et Takei, F. (1999). "Diversity of NK cell receptor repertoire in adult and neonatal mice." J Immunol 163(1): 212-6.

Lang, R., Patel, D., Morris, J. J., Rutschman, R. L. et Murray, P. J. (2002). "Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10." J Immunol 169(5): 2253-63.

Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." Annu Rev Immunol 16: 359-93.

Lanier, L. L., Corliss, B., Wu, J. et Phillips, J. H. (1998). "Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors." Immunity 8(6): 693-701.

Lanier, L. L. (2003). "Natural killer cell receptor signaling." Curr Opin Immunol 15(3): 308-14.

Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." Annu Rev Immunol 23: 225-74.

Lauw, F. N., Caffrey, D. R. et Golenbock, D. T. (2005). "Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin." Trends Immunol 26(10): 509-11.

Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L. et Phillips, J. H. (1996). "Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits." J Immunol 157(11): 4741-5.

Le Page, C., Sanceau, J., Drapier, J. C. et Wietzerbin, J. (1996). "Differential expression of inducible NO synthase in two murine macrophage cell lines." Immunology 89(2): 274-80.

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(1): 42-5.

Lentschat, A., Karahashi, H., Michelsen, K. S., Thomas, L. S., Zhang, W., Vogel, S. N. et Arditi, M. (2005). "Mastoparan, a G protein agonist peptide, differentially modulates TLR4- and TLR2-mediated signaling in human endothelial cells and murine macrophages." J Immunol 174(7): 4252-61.

Lévesque, A. (2002). "Stratégie de production d'anticorps monoclonaux spécifiques de Ly49B, un récepteur particulier des cellules NK murines." Université du Québec - INRS - Institut Armand-Frappier, Laval. Mémoire de Msc en Virologie et Immunologie: 129p.

Lian, R. H., Maeda, M., Lohwasser, S., Delcommenne, M., Nakano, T., Vance, R. E., Raulet, D. H. et Takei, F. (2002). "Orderly and nonstochastic acquisition of CD94/NKG2 receptors by developing NK cells derived from embryonic stem cells in vitro." J Immunol 168(10): 4980-7.

Liu, G., Zhai, Q., Schaffner, D., Bradburne, C., Wu, A., Hayford, A., Popov, S., Grene, E., Bailey, C. et Alibek, K. (2004). "IL-15 induces IFN-beta and iNOS gene expression, and antiviral activity of murine macrophage RAW 264.7 cells." Immunol Lett 91(2-3): 171-8.

Ljunggren, H. G. et Karre, K. (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today 11(7): 237-44.

Ljutic, B., Carlyle, J. R., Filipp, D., Nakagawa, R., Julius, M. et Zuniga-Pflucker, J. C. (2005). "Functional requirements for signaling through the stimulatory and inhibitory mouse NKR-P1 (CD161) NK cell receptors." J Immunol 174(8): 4789-96.

MacMicking, J., Xie, Q. W. et Nathan, C. (1997). "Nitric oxide and macrophage function." Annu Rev Immunol 15: 323-50.

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(8): 4180-6.

Mager, D. L., McQueen, K. L., Wee, V. et Freeman, J. D. (2001). "Evolution of natural killer cell receptors: coexistence of functional Ly49 and KIR genes in baboons." Curr Biol 11(8): 626-30.

Makrigiannis, A. P. et Anderson, S. K. (2000). "Ly49 gene expression in different inbred mouse strains." Immunol Res 21(1): 39-47.

- 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(8): 5034-43.
- Makrigiannis, A. P., Pau, A. T., Schwartzberg, P. L., McVicar, D. W., Beck, T. W. et Anderson, S. K. (2002). "A BAC contig map of the Ly49 gene cluster in 129 mice reveals extensive differences in gene content relative to C57BL/6 mice." Genomics 79(3): 437-44.
- Malarkannan, S. (2006). "The balancing act: inhibitory Ly49 regulate NKG2D-mediated NK cell functions." Semin Immunol 18(3): 186-92.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. et Locati, M. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol 25(12): 677-86.
- Mantovani, A., Sica, A. et Locati, M. (2005). "Macrophage polarization comes of age." Immunity 23(4): 344-6.
- Mantovani, A., Sica, A. et Locati, M. (2007). "New vistas on macrophage differentiation and activation." Eur J Immunol 37(1): 14-6.
- Marino, M. W., Dunn, A., Grail, D., Inglese, M., Noguchi, Y., Richards, E., Jungbluth, A., Wada, H., Moore, M., Williamson, B., Basu, S. et Old, L. J. (1997). "Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A 94(15): 8093-8.
- Matsuura, M., Saito, S., Hirai, Y. et Okamura, H. (2003). "A pathway through interferon-gamma is the main pathway for induction of nitric oxide upon stimulation with bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal cells." Eur J Biochem 270(19): 4016-25.
- McQueen, K. L., Freeman, J. D., Takei, F. et Mager, D. L. (1998). "Localization of five new Ly49 genes, including three closely related to Ly49c." Immunogenetics 48(3): 174-83.
- 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(7-8): 685-91.
- McVicar, D. W. et Burshtyn, D. N. (2001). "Intracellular signaling by the killer immunoglobulin-like receptors and Ly49." Sci STKE 2001(75): RE1.
- Miggin, S. M. et O'Neill, L. A. (2006). "New insights into the regulation of TLR signaling." J Leukoc Biol 80(2): 220-6.
- Mohamed, S. G., Sugiyama, E., Shinoda, K., Taki, H., Hounoki, H., Abdel-Aziz, H. O., Maruyama, M., Kobayashi, M., Ogawa, H. et Miyahara, T. (2007). "Interleukin-10

- inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells." Bone 41(4): 592-602.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Castriconi, R., Mingari, M. C. et Moretta, A. (2006). "Surface NK receptors and their ligands on tumor cells." Semin Immunol 18(3): 151-8.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol 73(2): 209-12.
- Murtaugh, M. P. et Foss, D. L. (2002). "Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation." Vet Immunol Immunopathol 87(3-4): 109-21.
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M. et Miyake, K. (2002). "Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution." Nat Immunol 3(7): 667-72.
- Nashleanas, M. et Scott, P. (2000). "Activated T cells induce macrophages to produce NO and control Leishmania major in the absence of tumor necrosis factor receptor p55." Infect Immun. 68(3): 1428-34.
- Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R. A. et Margulies, D. H. (2002). "Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination." Annu Rev Immunol 20: 853-85.
- Nemoto, Y., Otsuka, T., Niuro, H., Izuhara, K., Yamaoka, K., Nakashima, H. et Niho, Y. (1999). "Differential effects of interleukin-4 and interleukin-10 on nitric oxide production by murine macrophages." Inflamm Res 48(12): 643-50.
- Nylenna, O., Naper, C., Vaage, J. T., Woon, P. Y., Gauguier, D., Dissen, E., Ryan, J. C. et Fossum, S. (2005). "The genes and gene organization of the Ly49 region of the rat natural killer cell gene complex." Eur J Immunol. 35(1): 261-72.
- O'Connor, G. M., Hart, O. M. et Gardiner, C. M. (2006). "Putting the natural killer cell in its place." Immunology. 117(1): 1-10.
- O'Neill, L. A. (2006). "How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know." Curr Opin Immunol 18(1): 3-9.
- 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(10): 1417-23.
- Ochi, M., Tominaga, K., Okazaki, H., Yamamori, K., Wada, T., Shiba, M., Sasaki, E., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K. et Arakawa, T. (2006). "Regression of primary low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of duodenum after long-term treatment with clarithromycin." Scand J Gastroenterol 41(3): 365-9.

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(4930): 666-8.

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(3): 381-8.

Ortaldo, J. R., Winkler-Pickett, R. et Wiegand, G. (2000). "Activating Ly-49D NK receptors: expression and function in relation to ontogeny and Ly-49 inhibitor receptors." J Leukoc Biol 68(5): 748-56.

Ortaldo, J. R. et Young, H. A. (2003). "Expression of IFN-gamma upon triggering of activating Ly49D NK receptors in vitro and in vivo: costimulation with IL-12 or IL-18 overrides inhibitory receptors." J Immunol 170(4): 1763-9.

Oswald, I. P., Wynn, T. A., Sher, A. et James, S. L. (1992). "Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation." Proc Natl Acad Sci U S A 89(18): 8676-80.

Palmqvist, P., Lundberg, P., Persson, E., Johansson, A., Lundgren, I., Lie, A., Conaway, H. H. et Lerner, U. H. (2006). "Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway." J Biol Chem 281(5): 2414-29.

Paludan, S. R. (1998). "Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship." Scand J Immunol 48(5): 459-68.

Parker, L. C., Prince, L. R. et Sabroe, I. (2007). "Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity." Clin Exp Immunol 147(2): 199-207.

Perrée, M. (2003). "Expression de récepteurs Ly49 inhibiteurs par différentes populations leucocytaires." Université du Québec - INRS - Institut Armand-Frappier, Laval. Mémoire de Msc en Virologie et Immunologie: 137p.

Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y. et Fisher, P. B. (2004). "Interleukin-10 and related cytokines and receptors." Annu Rev Immunol 22: 929-79.

Pestka, S. (2007). "The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn." J Biol Chem 282(28): 20047-51.

Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rousso-Noori, L., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., Cohen, I. R. et Zipori, D. (2007). "Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions." Blood 109(4): 1422-32.

- Pietras, E. M., Saha, S. K. et Cheng, G. (2006). "The interferon response to bacterial and viral infections." J Endotoxin Res 12(4): 246-50.
- Plevy, S. E., Gemberling, J. H., Hsu, S., Dorner, A. J. et Smale, S. T. (1997). "Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins." Mol Cell Biol 17(8): 4572-88.
- 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(7): 592-8.
- Plougastel, B. F. et Yokoyama, W. M. (2006). "Extending missing-self? Functional interactions between lectin-like NKrp1 receptors on NK cells with lectin-like ligands." Curr Top Microbiol Immunol 298: 77-89.
- Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J. et Sambhara, S. (2004). "Innate immunity in aging: impact on macrophage function." Aging Cell 3(4): 161-7.
- Proteau, M. F., Rousselle, E. et Makrigiannis, A. P. (2004). "Mapping of the BALB/c Ly49 cluster defines a minimal natural killer cell receptor gene repertoire." Genomics 84(4): 669-77.
- Pyz, E., Marshall, A. S., Gordon, S. et Brown, G. D. (2006). "C-type lectin-like receptors on myeloid cells." Ann Med 38(4): 242-51.
- Rahim, S. S., Khan, N., Boddupalli, C. S., Hasnain, S. E. et Mukhopadhyay, S. (2005). "Interleukin-10 (IL-10) mediated suppression of IL-12 production in RAW 264.7 cells also involves c-rel transcription factor." Immunology 114(3): 313-21.
- Ratthe, C., Pelletier, M., Chiasson, S. et Girard, D. (2007). "Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling." J Leukoc Biol 81(5): 1287-96.
- 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.
- Raulet, D. H. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." Nat Rev Immunol 3(10): 781-90.
- Ravetch, J. V. et Bolland, S. (2001). "IgG Fc receptors." Annu Rev Immunol 19: 275-90.
- Rouhi, A., Gagnier, L., Takei, F. et Mager, D. L. (2006). "Evidence for epigenetic maintenance of Ly49a monoallelic gene expression." J Immunol. 176(5): 2991-9.

- Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., Matsumoto, F., Fukase, K., Kusumoto, S., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Kosugi, A. et Miyake, K. (2004). "Lipid A antagonist, lipid IVA, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization." Int Immunol 16(7): 961-9.
- Saleh, A., Davies, G. E., Pascal, V., Wright, P. W., Hodge, D. L., Cho, E. H., Lockett, S. J., Abshari, M. et Anderson, S. K. (2004). "Identification of probabilistic transcriptional switches in the Ly49 gene cluster: a eukaryotic mechanism for selective gene activation." Immunity 21(1): 55-66.
- Salkowski, C. A. et Vogel, S. N. (1992a). "IFN-gamma mediates increased glucocorticoid receptor expression in murine macrophages." J Immunol 148(9): 2770-7.
- Salkowski, C. A. et Vogel, S. N. (1992b). "Lipopolysaccharide increases glucocorticoid receptor expression in murine macrophages. A possible mechanism for glucocorticoid-mediated suppression of endotoxicity." J Immunol 149(12): 4041-7.
- Sambrook, J. G., Sehra, H., Coghill, P., Humphray, S., Palmer, S., Sims, S., Takamatsu, H. H., Wileman, T., Archibald, A. L. et Beck, S. (2006). "Identification of a single killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene in the porcine leukocyte receptor complex on chromosome 6q." Immunogenetics 58(5-6): 481-6.
- Sato, K., Yang, X. L., Yudate, T., Chung, J. S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R. P., Underhill, D., Cruz, P. D., Jr. et Ariizumi, K. (2006). "Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses." J Biol Chem 281(50): 38854-66.
- Saxena, R. K., Vallyathan, V. et Lewis, D. M. (2003). "Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells." J Biosci 28(1): 129-34.
- Scarpellino, L., Oeschger, F., Guillaume, P., Coudert, J. D., Levy, F., Leclercq, G. et Held, W. (2007). "Interactions of Ly49 family receptors with MHC class I ligands in trans and cis." J Immunol 178(3): 1277-84.
- Schilling, D., Thomas, K., Nixdorff, K., Vogel, S. N. et Fenton, M. J. (2002). "Toll-like receptor 4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter-like (Mal) contribute to maximal IL-6 expression in macrophages." J Immunol 169(10): 5874-80.
- Schmitz, F., Mages, J., Heit, A., Lang, R. et Wagner, H. (2004). "Transcriptional activation induced in macrophages by Toll-like receptor (TLR) ligands: from expression profiling to a model of TLR signaling." Eur J Immunol 34(10): 2863-73.
- Schmitz, F., Heit, A., Guggemoos, S., Krug, A., Mages, J., Schiemann, M., Adler, H., Drexler, I., Haas, T., Lang, R. et Wagner, H. (2007). "Interferon-regulatory-factor 1

controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells." Eur J Immunol 37(2): 315-27.

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. et Hume, D. A. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol 75(2): 163-89.

Schroder, K., Sweet, M. J. et Hume, D. A. (2006). "Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages." Immunobiology 211(6-8): 511-24.

Schroder, N. W., Opitz, B., Lamping, N., Michelsen, K. S., Zahringer, U., Gobel, U. B. et Schumann, R. R. (2000). "Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema glycolipids*." J Immunol 165(5): 2683-93.

Scott, M. J., Hoth, J. J., Stagner, M. K., Gardner, S. A., Peyton, J. C. et Cheadle, W. G. (2004). "CD40-CD154 interactions between macrophages and natural killer cells during sepsis are critical for macrophage activation and are not interferon gamma dependent." Clin Exp Immunol 137(3): 469-77.

Shepherd, E. G., Zhao, Q., Welty, S. E., Hansen, T. N., Smith, C. V. et Liu, Y. (2004). "The function of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in peptidoglycan-stimulated macrophages." J Biol Chem 279(52): 54023-31.

Shirota, H., Ishii, K. J., Takakuwa, H. et Klinman, D. M. (2006). "Contribution of interferon-beta to the immune activation induced by double-stranded DNA." Immunology 118(3): 302-10.

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(4): 2333-41.

Skold, M. et Cardell, S. (2000). "Differential regulation of Ly49 expression on CD4+ and CD4-CD8- (double negative) NK1.1+ T cells." Eur J Immunol 30(9): 2488-96.

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(3): 1068-79.

Smith, H. R., Heusel, J. W., Mehta, I. K., Kim, S., Dorner, B. G., Naidenko, O. V., Iizuka, K., Furukawa, H., Beckman, D. L., Pingel, J. T., Scalzo, A. A., Fremont, D. H. et Yokoyama, W. M. (2002). "Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 99(13): 8826-31.

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(1): 7-10.

- Stevensaert, F., Van Beneden, K., De Creus, A., Debacker, V., Plum, J. et Leclercq, G. (2003). "Ly49E expression points toward overlapping, but distinct, natural killer (NK) cell differentiation kinetics and potential of fetal versus adult lymphoid progenitors." J Leukoc Biol 73(6): 731-8.
- Stout, R. D., Suttles, J., Xu, J., Grewal, I. S. et Flavell, R. A. (1996). "Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice." J Immunol 156(1): 8-11.
- Stout, R. D. et Suttles, J. (2004). "Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments." J Leukoc Biol 76(3): 509-13.
- Takahashi, T., Yawata, M., Raudsepp, T., Lear, T. L., Chowdhary, B. P., Antczak, D. F. et Kasahara, M. (2004). "Natural killer cell receptors in the horse: evidence for the existence of multiple transcribed LY49 genes." Eur J Immunol 34(3): 773-84.
- Takaoka, A. et Yanai, H. (2006). "Interferon signalling network in innate defence." Cell Microbiol 8(6): 907-22.
- Takeda, K. et Akira, S. (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol 16(1): 3-9.
- Takeda, K. et Akira, S. (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol 17(1): 1-14.
- 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.
- 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(2): 718-26.
- Thomas, K. E., Galligan, C. L., Newman, R. D., Fish, E. N. et Vogel, S. N. (2006). "Contribution of interferon-beta to the murine macrophage response to the toll-like receptor 4 agonist, lipopolysaccharide." J Biol Chem 281(41): 31119-30.
- Toma-Hirano, M., Namiki, S., Miyatake, S., Arai, K. et Kamogawa-Schifter, Y. (2007). "Type I interferon regulates pDC maturation and Ly49Q expression." Eur J Immunol 37(10): 2707-14.
- Toyama-Sorimachi, N., Tsujimura, Y., Maruya, M., Onoda, A., Kubota, T., Koyasu, S., Inaba, K. et Karasuyama, H. (2004). "Ly49Q, a member of the Ly49 family that is selectively expressed on myeloid lineage cells and involved in regulation of cytoskeletal architecture." Proc Natl Acad Sci U S A 101(4): 1016-21.
- Toyama-Sorimachi, N., Omatsu, Y., Onoda, A., Tsujimura, Y., Iyoda, T., Kikuchi-Maki, A., Sorimachi, H., Dohi, T., Taki, S., Inaba, K. et Karasuyama, H. (2005). "Inhibitory NK

receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation- and cytokine stimulation-dependent manner." J Immunol 174(8): 4621-9.

Van Beneden, K., Stevenaert, F., De Creus, A., Debacker, V., De Boever, J., Plum, J. et Leclercq, G. (2001). "Expression of Ly49E and CD94/NKG2 on fetal and adult NK cells." J Immunol 166(7): 4302-11.

van Kooten, C. et Banchereau, J. (2000). "CD40-CD40 ligand." J Leukoc Biol 67(1): 2-17.

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(10): 1841-8.

Vance, R. E., Jamieson, A. M. et Raulet, D. H. (1999). "Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells." J Exp Med 190(12): 1801-12.

Vieira, O. V., Bucci, C., Harrison, R. E., Trimble, W. S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., Schreiber, A. D., Stahl, P. D. et Grinstein, S. (2003). "Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase." Mol Cell Biol 23(7): 2501-14.

Vila-del Sol, V. et Fresno, M. (2005). "Involvement of TNF and NF-kappa B in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN-gamma in macrophages." J Immunol 174(5): 2825-33.

Vivier, E., Nunes, J. A. et Vely, F. (2004). "Natural killer cell signaling pathways." Science 306(5701): 1517-9.

Watters, J. J., Sommer, J. A., Pfeiffer, Z. A., Prabhu, U., Guerra, A. N. et Bertics, P. J. (2002). "A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling: the MEK/ERK pathway is not essential for nitric oxide and interleukin 1beta production." J Biol Chem 277(11): 9077-87.

Weber-Nordt, R. M., Meraz, M. A. et Schreiber, R. D. (1994). "Lipopolysaccharide-dependent induction of IL-10 receptor expression on murine fibroblasts." J Immunol 153(8): 3734-44.

Wehinger, J., Gouilleux, F., Groner, B., Finke, J., Mertelsmann, R. et Weber-Nordt, R. M. (1996). "IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes." FEBS Lett 394(3): 365-70.

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(6): 1839-46.

- 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(3): 215-24.
- Wilhelm, B. T., Gagnier, L. et Mager, D. L. (2002). "Sequence analysis of the ly49 cluster in C57BL/6 mice: a rapidly evolving multigene family in the immune system." Genomics 80(6): 646-61.
- Wilhelm, B. T. et Mager, D. L. (2004). "Rapid expansion of the Ly49 gene cluster in rat." Genomics 84(1): 218-21.
- 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(7): 2074-82.
- 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(4): 1417-23.
- Wynn, T. A., Freund, Y. R. et Paulnock, D. M. (1992). "TNF-alpha differentially regulates Ia antigen expression and macrophage tumoricidal activity in two murine macrophage cell lines." Cell Immunol 140(1): 184-96.
- Xu, W. Y., Wang, L., Wang, H. M., Wang, Y. Q., Liang, Y. F., Zhao, T. T. et Wu, Y. Z. (2007). "TLR2 and TLR4 agonists synergistically up-regulate SR-A in RAW264.7 through p38." Mol Immunol 44(9): 2315-23.
- Yim, D., Jie, H. B., Lanier, L. L. et Kim, Y. B. (2000). "Molecular cloning, gene structure, and expression pattern of pig immunoreceptor DAP12." Immunogenetics 51(6): 436-42.
- Yim, D., Jie, H. B., Sotiriadis, J., Kim, Y. S. et Kim, Y. B. (2001). "Molecular cloning and expression pattern of porcine myeloid DAP12-associating lectin-1." Cell Immunol 209(1): 42-8.
- Yokoyama, W. M., Jacobs, L. B., Kanagawa, O., Shevach, E. M. et Cohen, D. I. (1989). "A murine T lymphocyte antigen belongs to a supergene family of type II integral membrane proteins." J Immunol 143(4): 1379-86.
- 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(7): 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(9): 3229-36.

Yokoyama, W. M. et Plougastel, B. F. (2003). "Immune functions encoded by the natural killer gene complex." Nat Rev Immunol 3(4): 304-16.

Yokoyama, W. M. et Kim, S. (2006a). "Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I." Immunol Rev 214: 143-54.

Yokoyama, W. M. et Kim, S. (2006b). "How do natural killer cells find self to achieve tolerance?" Immunity 24(3): 249-57.

Zhang, C., Wang, S. H., Lasbury, M. E., Tschang, D., Liao, C. P., Durant, P. J. et Lee, C. H. (2006). "Toll-like receptor 2 mediates alveolar macrophage response to *Pneumocystis murina*." Infect Immun 74(3): 1857-64.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A. et Ghosh, S. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." Science 303(5663): 1522-6.

Zhang, J., Croy, B. A. et Tian, Z. (2005). "Uterine natural killer cells: their choices, their missions." Cell Mol Immunol 2(2): 123-9.

Zhu, X., Chang, M. S., Hsueh, R. C., Taussig, R., Smith, K. D., Simon, M. I. et Choi, S. (2006). "Dual ligand stimulation of RAW 264.7 cells uncovers feedback mechanisms that regulate TLR-mediated gene expression." J Immunol 177(7): 4299-310.

Zidek, Z. et Frankova, D. (1999). "Interleukin-10 in combination with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha enhances in vitro production of nitric oxide by murine resident peritoneal macrophage." Eur Cytokine Netw 10(1): 25-32.

