

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

LUCIANE LAMOTTE

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

CARACTERISATION MOLECULAIRE ET FONCTIONNELLE DU RECEPTEUR CD229
HEPATOCYTAIRE

soutenu le 29 mars 2012

devant le jury suivant :

<i>Dr Bruno Canque</i>	Président
<i>Dr Pascal Maire</i>	Rapporteur
<i>Dr Hicham Bouhlal</i>	Examineur
<i>Dr Susan Saint-just</i>	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

*UMR 925 Inserm
Développement normal et pathologique
des lymphocytes et signalisation
3, rue des Louvels
80033 Amiens Cedex1 / hicham.bouhlal@u-picardie.fr*

Directeur : Pr Kaiss Lassoued

et de

*Laboratoire de pharmacologie cellulaire
et moléculaire de l'EPHE
Centre de recherche des cordeliers
UMPC-Inserm UMRS 972-Univ Paris Descartes
15, rue de l'école de médecine
75006 Paris / susan.saint-just@noos.fr*

Directeur : Dr Jean Chambaz

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la vie et de la terre

CARACTERISATION MOLECULAIRE ET FONCTIONNELLE DU RECEPTEUR CD229
HEPATOCYTAIRE

Luciane Lamotte

Résumé

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est l'un des cancers les plus fréquents dans le monde. C'est la troisième cause de décès liés au cancer. La compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à un CHC pourrait fournir des données importantes dans le développement de nouvelles thérapies. Un autre volet qui caractérise le développement du CHC est lié à l'incapacité de la réponse immunitaire à contrer les cellules cancéreuses. Certains récepteurs de la réponse immunitaire, pourraient donc être impliqués, dans l'inefficacité de la réponse immunitaire anti-cancéreuse, via des mécanismes de régulation négative. L'analyse de l'expression d'un panel de récepteurs du système immunitaire a mis en évidence l'importance d'un membre appartenant à la famille des récepteurs SLAM : le récepteur CD229.

Ce travail décrit pour la première fois, l'expression du récepteur CD229 à la surface des hépatocytes, jusqu'à maintenant connue dans les cellules d'origine hématopoïétique. Nous avons montré que le récepteur CD229 était fortement exprimé dans les hépatocytes sains, tandis que cette expression est significativement diminuée dans les cellules cancéreuses (CHC). De plus, nos travaux indiquent, une forte relation entre l'expression du récepteur CD229 et le pouvoir prolifératif des cellules cancéreuses. La perte de l'expression de ce récepteur par le tissu hépatique cancéreux, serait un moyen d'échapper à des signaux régulant négativement la prolifération. En se basant sur ces observations, nous avons analysé l'expression des protéines adaptatrices du récepteur CD229. Nous montrons nettement par CMF et IHC que la protéine SAP est exprimée dans les hépatocytes primaires sains alors que cette expression est fortement diminuée dans les lignées de CHC. Les résultats obtenus pour la protéine SAP corréleront avec ceux obtenus pour le récepteur CD229.

L'ensemble de nos travaux a permis de mettre en évidence, l'expression du récepteur CD229 dans le foie qui pourrait représenter un facteur protecteur contre la progression du CHC et de conclure qu'une diminution de son expression dans les cellules néoplasiques favoriserait leur croissance.

Mots-clés : Hépatocarcinome - Récepteur SLAM CD229 - SLAM Associated Protein – VHC

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	7
I - Généralités	7
II - Le carcinome hépatocellulaire	8
III - La famille des récepteurs SLAM	9
III - 1 Généralités	9
III - 2 Structure des récepteurs SLAM	10
III - 3 Description des différents membres de la famille des récepteurs SLAM	11
III - 3.1 Le récepteur CD150 (SLAMF1)	11
III - 3.2 Le récepteur CD48 (SLAMF2)	11
III - 3.3 Le récepteur CD244 (2B4 ou SLAMF4)	12
III - 3.4 Le récepteur CD84 (SLAMF5)	12
III - 3.5 Le récepteur NTB-A (SLAMF6)	12
III - 3.6 Le récepteur CD319 (CRACC ou CS1 ou SLAMF7)	13
III - 3.7 Le récepteur BLAME (B lymphocyte activator macrophage expressed) (SLAMF8)	13
III - 3.8 Le récepteur SF2001 (SLAMF9)	14
III - 3.9 Le récepteur CD229 (SLAMF3)	14
IV - Les molécules adaptatrices du récepteur CD229	15
IV - 1 La protéine AP-2 (Clathrin-associated adaptor protein) ou adaptine AP-2	15
IV - 2 La protéine Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)	15
V - Les protéines adaptatrices de la famille SAP (Slam-Associated Protein)	16
V - 1 La protéine SAP (SH2D1A)	17
V - 2 La protéine EAT2 (SH2D1B)	18
Hypothèse de travail et objectifs	19

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFP	Alpha-foeto-protéine
AP-2	Adaptator protein 2(adaptin2)
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférence
BCR	récepteur des cellules B (B-cell receptor)
BET	Bromure d'éthidium
3BP2	c-Abl Src homology 3 domain-binding protein-2
BSA	Bovin Serum Albumin (Albumine Sérique Bovine)
CD	Cluster of Différenciation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CHC	Carcinome hépatocellulaire
CMF	Cytométrie en flux
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
DAPI	4', 6'-Di Aminido-2-Phenyl Indo
°C	Degrés Celsius
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Désoxyribonucléotides
EAT-2	Ewing's sarcoma-activated transcript-2
EBV	Virus Epstein-Barr
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-Tétra acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique(epidermal growth factor)
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERT	EAT-2 related transducer
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPI	Glycosyl-phosphotidyl-inositol
Grb2	Growth factor receptor-bound protein2
H	Heure
HCA	Hépatite chronique active
HCl	Acide chlorydrique
Huh-7	Human hepatoma-7
Hrp	Horseradish peroxidase
IMF	Intensité moyenne de fluorescence
IF	Immunofluorescence
Ig	Immunoglobuline
IGF	Facteur de croissance apparenté à l'insuline (Insulin-like growth factor)
IHC	Immunohistochimie
ITSM	Immunoreceptor tyrosine-based switch motifs
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated extracellular signal regulated protein kinase
Min	Minutes
µg	Microgramme
µL	Microlitre
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mm	Millimètre
Ng	Nanogramme
PAL	Phosphatase alcaline
PI3K	Phosphatidy-linositol-3 kinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerization Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaine)
PLC	Phospholipase C
p/v	Poids pour volume
Ras	Proto oncogène Ras
Raf	Proto oncogène Raf
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Reverse transcription (transcription inverse)
SAP	SLAM Associated Protein
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SH2	Src-homology domain2

SH3	Src-homology domain3
SHIP	Src homology 2 domain-containing Inositol 5_-Phosphatase
SHP-2	Src homology 2 domain-containing phosphatase-2
SLAM	Signaling Lymphocytic Activation Molecule
Src	proto-oncogène protéines tyrosine kinase Src (sarcoma)
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBS	Tris Buffered Saline
TCR	Récepteurs des cellules T (T-cell receptor)
TEMED	Tétra Méthyl Ethylène Diamine
Tr/min	Tours par minute
U	Unité
Vav-1	Proto oncogène Vav-1
VEGF	Facteur de croissance endotheliale (Vascular endothelial growth factor)
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
v/v	Volume pour volume
WB	Western blot
XLP	Syndrome lymphoprolifératif lié à l'X

INTRODUCTION

I - Généralités

Le foie est un organe très important tant par sa taille (le plus volumineux de l'organisme) que par son rôle physiologique. Il est situé sous le diaphragme et traverse la cavité abdominale sur toute sa largeur. Il assure trois fonctions vitales :

- une fonction d'épuration (transformation ou destruction des produits toxiques absorbés par l'intestin),
- une fonction de synthèse (cholestérol et lipoprotéines),
- une fonction de stockage de l'énergie à partir des nutriments absorbés par le tube digestif. Il participe également à la régulation du taux de glucose dans le sang.

Différentes pathologies peuvent se développer au niveau du foie dont les principales sont :

- la cirrhose hépatique suite à une fibrose du tissu hépatique ce qui altère la fonction hépatique,
- la cirrhose biliaire primitive qui est une maladie auto-immune chronique des voies biliaires,
- les hépatites virales, qui regroupent les infections provoquées par des virus au dépend du tissu hépatique. Les hépatites virales B (VHB) ou C (VHC) sont responsables de 90% des dégradations hépatiques (Rehermann B *et al.*, 2005),
- l'hépatite chronique active (HCA) qui est reconnue comme un important facteur de risque du carcinome hépatocellulaire (CHC) (McGlynn KA, 2005),
- l'hépatite alcoolique aiguë qui est une affection sévère du foie. Elle est liée à la toxicité indirecte de l'alcool, entraînant une mort cellulaire brutale,
- Les Aflatoxines qui sont des toxines incriminées depuis longtemps dans la genèse du CHC en Asie et en Afrique, (Peers F *et al.*, 1987)
- l'hémochromatose qui est une maladie autosomique récessive se caractérisant par une surcharge en fer dans l'organisme.

II - Le carcinome hépatocellulaire

Le CHC ou hépatocarcinome est une tumeur maligne du foie. Il est dû, soit à une prolifération maligne des hépatocytes, soit à une résistance à l'apoptose (mort cellulaire programmée), soit aux deux à la fois. Les hépatocytes se transforment en hépatomes, acquièrent progressivement un phénotype tumoral et perdent ainsi leurs fonctions. C'est la troisième cause de décès concernant le cancer dans les populations occidentales (Llovet JM *et al.*, 2003). L'incidence annuelle mondiale est d'environ 500 000 nouveaux cas/an (El-Serag HB, 2011). Le CHC se développe le plus souvent à la suite d'une cirrhose (75 à 80 % des cas), plus rarement après une hépatopathie chronique non cirrhotique et exceptionnellement sur un foie sain.

Au premier stade du CHC, les tests biologiques hépatiques sont généralement normaux, en dehors, de taux légèrement élevés de bilirubine, de phosphatase alcaline (PAL) et des transaminases. Bien que l'examen biologique ne soit pas très spécifique, l'examen essentiel pour le diagnostic du CHC est le dosage de l'alpha-foeto-protéine (AFP) dans le sang. En effet, dans les grosses tumeurs, on retrouve des taux très élevés d'AFP alors que la production d'AFP est très faible dans les petites tumeurs. Le diagnostic se base alors sur des examens anatomo-pathologiques. (Pour Revue 2010) Thésaurus National de Cancérologie Digestive Version: 23/09/2010.

L'incidence croissante du CHC a généré de nombreuses recherches afin de comprendre les mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires impliqués dans la maladie avec l'espoir de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces dernières années, les connaissances dans le domaine de la cancérogenèse moléculaire ont permis le développement

de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées pour une variété de cancers, parmi lesquelles l'utilisation d'anticorps monoclonaux et d'inhibiteurs de tyrosine kinases semble être prometteuse (Bao JJ *et al.*, 1996 ; Farazi PA *et al.*, 2006).

Parmi les principales cibles moléculaires de ces nouvelles thérapies figurent :

- Le facteur de croissance endothéliale (Vascular endothelial growth factor -VEGF) impliqué dans l'angiogenèse,
- Le facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor, EGF) ou le facteur de croissance insulinémique ayant une structure chimique semblable à celle de l'insuline (Insulin-like Growth Factor - IGF), ainsi que les voies PI3K-AKT-mTOR (PI3K pour Phosphatidylinositol 3-kinases – AKT est un nom de classement provisoire pour une souche de souris en développement spontané des lymphomes thymiques et le t pour transforming - mTOR pour mammalian Target of Rapamycin) et Ras-Raf-MEK-MAPK (Ras pour proto oncogène Ras – Raf pour proto oncogène Raf - MEK pour Mitogen-activated extracellular signal regulated protein kinase – MAPK pour mitogen-activated protein kinase) impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire, (Tanaka S *et al.* 2009).

L'autre volet qui caractérise le développement du CHC, est lié à l'incapacité de la réponse immunitaire à contrer les cellules cancéreuses. Certains récepteurs de la réponse immunitaire, pourraient être impliqués, dans l'inefficacité de la réponse immunitaire anti- cancéreuse, par des mécanismes de régulation négative.

Les travaux menés en parallèle, par notre équipe de recherche, sur le processus d'entrée du VHC, ont montré l'expression d'un membre de la famille des récepteurs SLAM (Signaling Lymphocyte Activating Molecule) dans le tissu hépatique. Au cours des expériences visant à caractériser ce récepteur dans le tissu hépatique, nous avons montré que sa stimulation diminuait la production de certains facteurs solubles tels que l'EGF, impliqués dans les processus d'angiogenèse, ainsi que dans la survie de l'hépatocarcinome.

III - La famille des récepteurs SLAM

III - 1 Généralités

Les récepteurs de la famille SLAM appartiennent au sous ensemble du récepteur CD2 et font partie de la superfamille des immunoglobulines (Sayre PH *et al.*, 1989). Ils jouent un rôle crucial dans la régulation des différentes étapes de l'immunité cellulaire. Ils sont aussi présents dans de nombreux types de cellules immunitaires (lymphocytes T, lymphocytes B) où ils peuvent stimuler ou inhiber la fonction des récepteurs activateurs primaires (les récepteurs des cellules T : TCR et les récepteurs des cellules B : BCR) (Cruz-Munoz ME *et al.*, 2009 ; Dong Z *et al.*, 2009). Ils régulent notamment les interactions cellulaires impliquées à la fois dans les réponses immunes cellulaires et humorales.

Leurs fonctions ont été démontrées au cours de la réponse immunitaire, qu'elle soit innée ou adaptative (Romero X *et al.*, 2004 ; Veillette A *et al.*, 2006 ; Ma CS *et al.*, 2007 ; Veillette A *et al.*, 2007 ; Calpe S *et al.*, 2008 ; Schwartzberg P.L *et al.*, 2009)

La famille des récepteurs SLAM comprend neuf membres : SLAMF1 (CD150; SLAM), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (CD229; Ly9), SLAMF4 (CD244 ; 2B4), SLAMF6 (natural killer, T- and B-cell antigen NTBA), SLAMF5 (CD84), et SLAMF7 (CD2-like receptor activating cytotoxic cells : CRACC ou CD319 ou CS1), SLAMF8 (BLAME), SLAMF9 (SF2001), (Engel P *et al.*, 2003 ; Detre C *et al.*, 2010) (Tableau 1). Ces récepteurs sont connus pour être exclusivement exprimés à la surface des cellules immunitaires (De la Fuente MA *et al.*, 2001).

Les gènes codant pour les membres de cette famille sont tous localisés sur le chromosome 1

chez l'Homme (Sidorenko SP *et al.*, 2003)

Ces membres sont regroupés dans un segment génomique de 359 kb péri-centromérique chez l'homme. L'arrangement des gènes de la famille des récepteurs SLAM est identique chez la souris et l'homme, seule diffère l'orientation du sens de leur transcription (Morra M *et al.*, 2001 ; Veillette A. *et al.*, 2010 ; Cannons J. *et al.*, 2011) (Figure 4). L'organisation génomique des gènes codant la famille des récepteurs SLAM suggère qu'ils proviennent d'une série de duplications à partir d'un gène ancestral commun (Wong YW *et al.*, 1990 ; Kingsmore SF *et al.*, 1995 ; Veillette A. *et al.*, 2010 ; Cannons J. *et al.*, 2011).

III - 2 Structure des récepteurs SLAM

Comme le montre la figure 5, les récepteurs de la famille SLAM sont des glycoprotéines transmembranaires qui possèdent un domaine extracellulaire, un segment transmembranaire et une région cytoplasmique (Wang N *et al.*, 2001 ; Tovar V *et al.*, 2002 ; Fraser CC *et al.*, 2002 ; Detre C *et al.*, 2010 ; Cannons J *et al.*, 2011). Le domaine extracellulaire est composé d'un domaine variable V-like et d'un domaine constant C2-like (Davis SJ *et al.*, 1996), à l'exception du récepteur CD229 qui lui comprend quatre domaines Ig-like (répétition des motifs V-like et C2-like)(Sandrin MS *et al.*, 1992 ; 1996)(Figure 5). Ils sont activés par interactions homotypiques *via* le domaine extracellulaire V-like sur l'extrémité N-terminale, à l'exception du récepteur CD244 qui lui interagit avec le récepteur CD48 (Brown MH *et al.*, 1998 ; Cao E *et al.*, 2006 ; Velikovsky CA *et al.*, 2007 ; Yan Q *et al.*, 2007).

La région cytoplasmique est caractérisée par la présence de plusieurs résidus tyrosine (Y), et d'au moins 1 motif ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motifs) qui a pour séquence : TxYxxI/V, où « T » désigne une thréonine, « I » une isoleucine, « Y » une tyrosine, « V » une valine et x désigne n'importe quel acide aminé (Sayos J *et al.*, 1998 ; Shlapatska LM *et al.*, 2001 ; Chen R *et al.*, 2006). Après activation, les motifs tyrosines sont phosphorylés par des protéines kinases, comme celles de la famille des proto-oncogène protéines tyrosine kinase Src (*sarcoma*). Les motifs ITSM ainsi phosphorylés permettent le recrutement de protéines à domaines SH2 (Src Homology 2), comme la tyrosine phosphatase SHP-2 (Src homology 2 domain-containing phosphatase-2) ou l'inositol phosphatase SHIP (Src homology 2 domain-containing Inositol 5_α-Phosphatase). Les protéines adaptatrices de la famille SAP (SLAM-associated Protein) comme la protéine du proto-oncogène c-Fyn ou la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K) peuvent également être recrutées sur ces motifs ITSM (Mikhalap SV *et al.*, 1999 ; Tangye SG *et al.*, 1999 ; Latour S *et al.*, 2001a ; Howie D *et al.*, 2002 ; Li C *et al.*, 2003 a et b).

III - 3 Description des différents membres de la famille des récepteurs SLAM

III - 3.1 Le récepteur CD150 (SLAMF1)

Le récepteur CD150 (SLAMF1) est une glycoprotéine, qui a été identifié en 1993 sous le nom d'IPO-3 à la surface des lymphocytes B activés, et qui est impliqué dans l'activation des lymphocytes T (Sidorenko SP *et al.*, 1993 ; Cocks BG *et al.*, 1995). Ce récepteur est également exprimé dans les thymocytes, plaquettes, cellules dendritiques matures, lymphocytes B naïfs, et les lymphocytes T mémoires, où son expression augmente suite à son activation *in vitro*. Par ailleurs, le récepteur CD150 est également exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques (CSHs), (Punnonen J *et al.*, 1997 ; Castro AG *et al.*, 1999 ; Henning G *et al.*, 2001 ; Kruse M *et al.*, 2001 ; Romero X *et al.*, 2004 ; Nanda N. *et al.*, 2005 ; Kiel MJ *et al.*, 2005). Il joue de nombreux rôles dans l'immunité innée et adaptative non seulement en tant que molécule co-stimulatrice, mais aussi en tant que récepteur viral (Tatsuo H *et al.*, 2000).

III - 3.2 Le récepteur CD48 (SLAMF2)

Le récepteur CD48 (SLAMF2) est une protéine glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), identifié dans les années 1980 sous le nom de BLAST-1 (Thorley-lawson DA *et al.*, 1987 et 1989). Plus tard, il est identifié comme ligand du récepteur CD2 (Arulanandam AR *et al.*, 1993). En 1998, on découvre que le récepteur CD48 se lie préférentiellement au récepteur 2B4 (CD244) (Brown M.H *et al.*, 1998).

Grâce à sa structure GPI, le récepteur CD48 peut être clivé après activation et se retrouver sous forme soluble dans la circulation. Il est exprimé dans diverses cellules hématopoïétiques, son expression est régulée par les produits viraux ou bactériens et les protéines immuno-associées. (Boles KS *et al.*, 2001; Elishmereni M *et al.*, 2010).

III - 3.3 Le récepteur CD244 (2B4 ou SLAMF4)

Le récepteur CD244 (SLAMF4) est une glycoprotéine de surface caractérisé en 1993, lié au récepteur CD2 et impliqué dans la régulation des cellules NK et la fonction de lymphocytes T (Mathew PA. *et al.*, 1993). Il se lie préférentiellement au récepteur CD48 (Brown M. H. *et al.*, 1998). Son interaction hétérotypique permet d'activer la cytotoxicité et la production d'IFN- de ces cellules (Tangye SG *et al.*, 2000 ; Speiser DE *et al.*, 2001 ; Gao N *et al.*, 2006 ; Lee KM *et al.*, 2006). Il a récemment été démontré que la N-glycosylation de cette glycoprotéine est indispensable à son interaction avec le récepteur CD48, et ainsi à ses fonctions de régulation (Margraf-Schönfeld S *et al.*, 2011). Le récepteur CD244 peut également être un récepteur inhibiteur des cellules NK et CD8⁺ (Lee KM *et al.*, 2004 ; Blackburn *et al.*, 2009).

III - 3.4 Le récepteur CD84 (SLAMF5)

Le récepteur CD84 (SLAMF5) est une glycoprotéine de surface identifié et caractérisé en 1997 (De la fuente MA *et al.*, 1997). Ce récepteur est exprimé sur les cellules hématopoïétiques, lymphocytes B, T, mais aussi les monocytes, macrophages, granulocytes, et cellules dendritiques (Krause S *et al.*, 2000 ; Romero X *et al.*, 2004). Contrairement à la souris, les cellules NK humaines ne l'expriment pas (Roncagalli R *et al.*, 2005). Le récepteur CD84 est une molécule co-stimulatrice qui induit la prolifération des lymphocytes T activés et leur production d'IFN- (Martin M *et al.*, 2001 ; Tangye SG *et al.*, 2003).

III - 3.5 Le récepteur NTB-A (SLAMF6)

Le récepteur NTB-A (SLAMF6) est une glycoprotéine de surface caractérisé en 2001 (Bottino C *et al.*, 2001 ; Fraser C.C *et al.*, 2002). Il est exprimé sur les cellules NK, les lymphocytes T, les lymphocytes B, et éosinophiles (Munitz A *et al.*, 2005). Il a récemment été montré que le récepteur NTB-A était fortement exprimé dans les monocytes ainsi que les cellules dendritiques (Matesanz- Isabel J *et al.*, 2011). Il est présent sur les lymphocytes B, quelque soit le stade de différenciation, du stade pro-B, aux lymphocytes mémoires.

De plus, il joue un rôle important tout comme le récepteur CD244, dans les cellules NK en induisant la prolifération de ces cellules, ainsi que la production de cytokines (Flaig R.M *et al.*, 2004 ; Falco M *et al.*, 2004). Une autre étude a montré par ailleurs que le récepteur NTB-A pourrait devenir une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des leucémies et lymphomes, grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre cette protéine induisant une activité anti-tumorale des cellules de lymphome (Korver W *et al.*, 2007).

III - 3.6 Le récepteur CD319 (CRACC ou CS1 ou SLAMF7)

Le récepteur CD319 (SLAMF7) est une glycoprotéine de surface caractérisé en 2001 sous le nom de CS1 (Boles KS *et al.*, 2001). Il est exprimé sur les cellules NK, les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, les lymphocytes B activés, et les cellules dendritiques matures (Boles KS *et al.*, 2001 ; Bouchon A *et al.*, 2001). Il induit la cytotoxicité des cellules NK. Bien que ses fonctions dans les lymphocytes B et T soient encore méconnues, il pourrait jouer un rôle

activateur des lymphocytes B, puisque la stimulation du récepteur CD40 induit la surexpression du récepteur CD319 (Bouchon A *et al.*, 2001).

III - 3.7 Le récepteur BLAME (B lymphocyte activator macrophage expressed) (SLAMF8)

Le récepteur BLAME (SLAMF8) est une glycoprotéine de surface caractérisé en 2001 (Kingsbury GA *et al.*, 2001). Ce récepteur est exprimé sur les lymphocytes B, les monocytes activés et les cellules dendritiques. Les études menées dans le modèle murin ont permis d'avancer l'hypothèse selon laquelle le récepteur BLAME pourrait jouer un rôle dans l'engagement des lymphocytes B et/ou la modulation du signal par le BCR (Kingsbury GA *et al.*, 2001). Depuis 2001, très peu de recherches ont été menées sur cette protéine. C'est seulement en 2011, que l'expression de la protéine BLAME a été détectée de manière très faible sur les monocytes du sang périphérique, ainsi que sur les lymphocytes B matures (Matesanz –Isabel J *et al.*, 2011).

III - 3.8 Le récepteur SF2001 (SLAMF9)

Le récepteur SF-2001 (SLAMF9) est une glycoprotéine de surface caractérisé en 2001 sous le nom de CD2-F10 (Fennelly JA *et al.*, 2001 ; Fraser CC *et al.*, 2002). Il est exprimé dans les monocytes humains, les lymphocytes T et B ainsi que dans les cellules dendritiques (Fennelly JA *et al.*, 2001). Comme le récepteur BLAME, le récepteur SF-2001 possède une queue cytoplasmique de petite taille, sans motif « tyrosine ni d'autres motifs de signalisation ». Le ligand de cette protéine ainsi que son rôle ne sont toujours pas connus (Calpe S *et al.*, 2008).

III - 3.9 Le récepteur CD229 (SLAMF3)

Le récepteur CD229 (SLAMF3), auquel nous avons consacré l'essentiel de nos travaux et présentés dans ce mémoire, est une glycoprotéine identifié chez l'homme en 1996 (Sandrin MS *et al.*, 1996). Il est exprimé sur les lymphocytes T matures, lymphocytes B, les thymocytes simples positifs CD4⁺ ou CD8⁺, les cellules myéloïdes : macrophages et les cellules dendritiques (De la fuente MA *et al.*, 2001 ; Romero X *et al.*, 2004 ; Sintès J *et al.*, 2007 ; Sintès J *et al.*, 2008). Il est très faiblement exprimé sur les cellules NK humaines et absent sur les monocytes, granulocytes, érythrocytes et plaquettes (De la fuente MA *et al.*, 2001 ; Romero X *et al.*, 2005). Le récepteur CD229 est le seul membre de la famille des récepteurs SLAM capable de s'internaliser. Il a été mis en évidence que des protéines telles qu'AP-2(adaptator protein 2), Grb2 (Growth factor receptor-bound protein2) et 3BP2 (ou SH3BP2 pour c-Abl Src homology 3 domain-binding protein-2), interagissent avec le récepteur CD229 dans les lymphocytes T matures. Ces protéines une fois activées, favorisent son endocytose (Martin M *et al.*, 2005 ; Del Valle JM *et al.*, 2003). Comme les autres membres de la famille des récepteurs SLAM, le récepteur CD229 peut recruter la protéine SAP et la protéine EAT-2 (Erwing's sarcoma-activated transcript-2), grâce au domaine SH2 (Morra M *et al.*, 2001). Il a été démontré que la protéine SAP est nécessaire pour la phosphorylation du récepteur CD229 dans les thymocytes et les cellules T périphériques (Simarro M *et al.*, 2004).

A part ses propriétés structurales et biochimiques, peu de données sont connues concernant son rôle. Il a cependant été montré, qu'il était impliqué dans la régulation des interactions entre les lymphocytes B et T (Romero X *et al.*, 2005). Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que l'interaction du récepteur CD229 sur les lymphocytes T primaires humains induisait rapidement la phosphorylation de ses tyrosines et diminuait en partie l'activation de ERK (Extracellular signal-regulated kinases) et la production d'IFN induite par un anticorps anti-CD3 (Martin M *et al.*, 2005). Cette étude suggère que le récepteur CD229 pourrait jouer un rôle inhibiteur dans l'activation des lymphocytes T.

Une étude récente a montré que le récepteur CD229 est fortement exprimé dans les cellules humaines de myélome (Atanackovic D *et al.*, 2011). La régulation négative de ce récepteur à

l'aide d'ARN interférence (ARNi) réduit le nombre des cellules cancéreuses. Par ailleurs, il a été montré que l'utilisation d'anticorps dirigé contre ce récepteur, active la lyse des cellules de myélome. Le récepteur CD229 pourrait être ainsi utilisé en tant que marqueur diagnostique de cette maladie et être utilisé comme cible thérapeutique.

IV - Les molécules adaptatrices du récepteur CD229

IV - 1 La protéine AP-2 (Clathrin-associated adaptor protein) ou adaptine AP-2

Elle représente un élément clé du mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine. C'est un complexe stable constitué de deux sous unités μ et σ (100-115 kDa) (adaptines), de sous unité μ 2 (50 kDa), et d'une petite sous unité σ 2 (17 kDa).

Des études réalisées sur des cellules, en utilisant des dominants négatifs et des approches d'ARNi, ont montré que la protéine AP-2 est nécessaire à l'internalisation rapide (Ohno, H 2006). En 2003, le récepteur CD229 est décrit comme le seul membre des récepteurs SLAM pouvant interagir avec la sous unité μ 2 du complexe AP-2. La protéine AP-2 se lie directement à la tyrosine Y⁴⁷⁰ présente sur le domaine intracellulaire du récepteur CD229. La phosphorylation de cette tyrosine induite par la protéine kinase Fyn, bloque la liaison avec la protéine AP-2. Il a été démontré, en utilisant des mutants de la tyrosine Y⁴⁷⁰, que cette tyrosine est essentielle à l'endocytose du récepteur CD229 par le complexe AP-2 (Del valle JM *et al.*, 2003). L'endocytose du récepteur serait due à un mécanisme essentiel pour la cellule permettant ainsi de moduler rapidement l'expression du récepteur CD229 à la surface.

IV - 2 La protéine Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)

C'est une protéine adaptatrice impliquée dans la transduction du signal. Elle est composée d'un domaine SH2 flanqué de chaque côté par un domaine SH3 (*Src-kinase Homology domain 3*). L'inhibition de la fonction Grb2 altère les processus de développement de divers organismes et la prolifération de différents types cellulaires. La protéine Grb2 est connue pour sa capacité à se lier au récepteur à activité tyrosine kinase de type EGFR (Epidermal Growth Factor receptor) (Lowenstein EJ *et al.*, 1992; Egan S. E *et al.*, 1993).

Le récepteur CD229 est le seul membre des SLAM capable de se lier directement à Grb2, protéine adaptatrice connue pour activer la voie de signalisation Ras/MAPK. Après phosphorylation du récepteur CD229 par la protéine kinase Fyn, la tyrosine Y⁶⁰⁶ du récepteur interagit avec le domaine SH2 de la protéine Grb2 dans les lymphocytes T (Martin M *et al.*, 2005)(Figure 7). Le site de liaison de la protéine Grb2 est nécessaire pour l'internalisation du récepteur dans les lymphocytes T, après l'engagement du récepteur CD229 ou TCR. L'utilisation de mutants de la tyrosine Y⁶⁰⁶ empêche toute internalisation du récepteur.

L'interaction entre le récepteur CD229 et la protéine Grb2 régule l'internalisation du récepteur par une voie dépendante de la PI3K et contrôle ainsi le taux de CD229 à la surface. Par ailleurs, la colligation du récepteur CD229 avec le TCR inhibe la phosphorylation de ERK, alors que la colligation du TCR avec les autres membres de la famille SLAM l'active (Martin M *et al.*, 2005 ; Bouchon A *et al.*, 2001 ; Henning G *et al.*, 2001). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que l'interaction du récepteur CD229 et de la protéine Grb2, empêcherait la liaison à d'autres molécules de signalisation.

V - Les protéines adaptatrices de la famille SAP (Slam-Associated Protein)

La famille SAP comprend trois protéines adaptatrices à savoir : SAP, EAT-2 et ERT (EAT-2 related transducer). Les protéines SAP et EAT-2 sont exprimées à la fois chez l'homme et chez la souris tandis que la protéine ERT n'est retrouvée que chez la souris (Engel P *et al.*, 2003 ; Veillette A *et al.*, 2006a ; Ma CS *et al.*, 2007). Il a été mis en évidence que l'expression de ces protéines dans les cellules hématopoïétiques est principalement régulée par des cytokines. En

effet, dans les cellules NK l'expression de la protéine SAP est augmentée en réponse à l'IL-2, IL-12, INF- γ , alors qu'aucune variation d'expression de la protéine EAT-2 n'est observée en réponse à ces différentes cytokines (Endt J *et al.*, 2007). Les protéines SAP et EAT-2 sont constituées d'un domaine SH2 unique (Figure 8). Ce domaine SH2 peut interagir avec des résidus tyrosines phosphorylés présents sur d'autres protéines.

Des études ont montré que, le récepteur CD229 fixe la protéine SAP dans les lymphocytes T et la protéine adaptatrice EAT-2 dans les lymphocytes B *via* les résidus Y⁵⁵⁸ et Y⁵⁸¹ présents dans les motifs ITSM (Morra M *et al.*, 2001). En revanche, ces deux protéines sont exprimées simultanément et interagissent avec le récepteur CD229 dans les cellules NK. Les protéines adaptatrices de la famille SAP peuvent interagir avec tous les membres de la famille des récepteurs SLAM, à l'exception du récepteur CD319, qui ne peut s'associer qu'avec la protéine EAT-2, et probablement la protéine ERT (Bouchon A *et al.*, 2001 ; Tassi I and Colonna M, 2005 ; Cruz monnoz ME *et al.*, 2009 ; Veillette A *et al.*, 2010).

La protéine ERT a été découverte plus récemment. Elle comporte 82% d'identité de séquence avec EAT-2 et environ 40% avec SAP (Roncagalli R *et al.*, 2005 ; Calpe S *et al.*, 2006). Chez les hommes, le gène codant ERT est un pseudogène, non fonctionnel (Veillette A *et al.*, 2010).

V - 1 La protéine SAP (SH2D1A)

Le gène SAP a été identifié en 1998, en recherchant le gène responsable du syndrome de lymphoprolifération liée à l'X (XLP). (Sayos J *et al.*, 1998 ; Coffey AJ *et al.*, 1998 ; Nichols KE *et al.*, 1998). La même année, la protéine SAP a été caractérisée comme protéine partenaire des récepteurs SLAM (Sayos J *et al.*, 1998). La protéine SAP joue un rôle majeur dans l'induction de la cytotoxicité des lymphocytes T et cellules NK. Il a été montré que certains virus comme EBV (Epstein-Barr virus) ou encore des bactéries telles que les mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*), agents infectieux responsables respectivement de la tuberculose et de la lèpre sont également capables de moduler l'expression de la protéine SAP dans les cellules du système immunitaire (Quiroga MF *et al.*, 2007 ; Chuang TY *et al.*, 2008). Après être recrutée au niveau des motifs ITSM, la protéine SAP recrute à son tour la protéine kinase Fyn, par l'intermédiaire de l'arginine en position 78 présente sur son domaine SH2 (Latour S *et al.*, 2001, 2003 ; Chan B *et al.*, 2003 ; Veillette A *et al.*, 2007). Cette arginine interagit directement avec le domaine SH3 de la protéine kinase Fyn, permettant ainsi son recrutement et son activation. L'interaction de la protéine SAP avec la protéine kinase Fyn est spécifique, puisque l'arginine 78 de la protéine SAP ne se lie pas aux autres membres de la famille Src (Veillette A *et al.*, 2007). La protéine SAP s'associe aux récepteurs SLAM par l'intermédiaire des motifs ITSM dans le domaine cytoplasmique. La capacité de la protéine SAP à transmettre un signal en aval du récepteur CD229 dans les cellules T est le résultat de son aptitude à recruter et activer sélectivement la protéine kinase Fyn (Chan B *et al.*, 2003 ; Latour S *et al.*, 2001 ; Simarro M *et al.*, 2004). La protéine kinase Fyn phosphoryle à son tour les résidus tyrosines dans le domaine cytoplasmique des récepteurs SLAM. Par exemple, la protéine SAP est recrutée par le récepteur 2B4 et le récepteur NTB-A, induisant la phosphorylation de la protéine Vav1 et de la protéine CBL conduisant ainsi à la cytotoxicité des cellules NK et lymphocytes CD8⁺.

V - 2 La protéine EAT2 (SH2D1B)

Les transcrits EAT-2 ont été caractérisés en 1996, comme transcription aberrante dans les fibroblastes transformés par l'oncogène Erwing's associé au sarcome *EWS-FL11* (Thompson AD *et al.*, 1996). Le gène qui code pour EAT-2 (SH2D1B chez l'homme et Sh2d1b1 chez la souris) est localisé sur le chromosome 1 chez l'homme comme chez la souris, à 1500 kb et 1300 kb du locus des récepteurs SLAM, respectivement. Ce gène code un polypeptide de 132 acides aminés (Latour S *et al.*, 2004). La protéine EAT-2 joue un rôle dans les cellules NK, les

lymphocytes B, les cellules dendritiques, et les cellules hématopoïétiques comme les macrophages (Coffey AJ *et al.*, 1998 ; Nichols KE *et al.*, 1998 ; Parolini S *et al.*, 2000 ; Sayos J *et al.*, 1998 ; Morra M *et al.*, 2001b ; Veillette A *et al.*, 2006b, 2007). Il a été décrit comme suppresseur de la cytotoxicité naturelle et de la production d'IFN-. Contrairement à la protéine SAP, les protéines EAT-2 et ERT ne possèdent pas le résidu arginine 78, et sont donc incapables de recruter la protéine kinase Fyn par ce mécanisme (Engel P *et al.*, 2003 ; Veillette A *et al.*, 2006a ; 2007 ; Ma CS *et al.*, 2007). Ils contiennent un ou deux résidus tyrosines dans le domaine C-terminal, qui pourraient être phosphorylés permettant ainsi le recrutement d'autres molécules contenant un domaine SH2. L'identité de ces effecteurs n'est pas encore connue, néanmoins des données récentes suggèrent que la phospholipase C (PLC)- γ pourrait être recrutée par la tyrosine Y¹²⁷ de la protéine EAT-2 chez l'homme (Clarkson NG and Brown MH 2009). Ces résidus tyrosine jouent un rôle critique dans les effets activateurs et inhibiteurs de la protéine EAT-2 dans les cellules NK (Roncagalli R *et al.*, 2005 ; Cruz munoz ME *et al.*, 2009 ; Clarkson NG and Brown MH 2009). Une autre hypothèse existe selon laquelle la protéine EAT-2 bloquerait toute interaction entre les récepteurs SLAM et la protéine SAP et toute autre molécule (Latour S and Veillette A 2004).

HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

Une partie des travaux de recherches auxquels j'ai participé, est présentée dans ce mémoire de fin d'étude de l'EPHE. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'une nouvelle thématique initiée par le Dr H Bouhlal, au sein de l'unité de recherche Inserm (UMR 925). La principale thématique traitée dans l'équipe de recherche, consiste à étudier la réponse immunitaire antivirale et anti-cancéreuse, induites lors de l'infection par le virus de l'hépatite C. Cette infection est parmi les causes principales de la transformation des hépatocytes, qui dans 3% des cas, aboutissent à un cancer primitif du foie ou CHC.

L'hypothèse de ce travail est basée sur l'incapacité de la réponse immunitaire (CTL, NK, macrophage et production des cytokines) à contrer les cellules cancéreuses. Certains récepteurs de la réponse immunitaire, pourraient être impliqués dans son inefficacité par des mécanismes modulant négativement cette réponse.

Des études préliminaires ont porté sur l'analyse de l'expression d'un panel de récepteurs du système immunitaire (récepteurs de la réponse innée, molécules de co-stimulation). Elles ont montré l'expression d'un membre appartenant à la famille des récepteurs SLAM, il s'agit du récepteur CD229.

L'objectif de ce travail est de caractériser ce récepteur CD229 hépatocytaire, connu jusqu'à lors dans les cellules d'origine hématopoïétique, et d'identifier ses partenaires moléculaires ainsi que son rôle, dans le foie.

BIBLIOGRAPHIE

Arulanandam AR, Moingeon P, Concino MF, Recny MA, Kato K, Yagita H, Koyasu S, Reinherz EL. A soluble multimeric recombinant CD2 protein identifies CD48 as a low affinity ligand for human CD2: divergence of CD2 ligands during the evolution of humans and mice. *J Exp Med*. 1993 May 1;177(5):1439-50.

Atanackovic D, Panse J, Hildebrandt Y, Jadczak A, Kobold S, Cao Y, Templin J, Meyer S, Reinhard H, Bartels K, Lajmi N, Zander AR, Marx AH, Bokemeyer C, Kröger N. Surface molecule CD229 as a novel target for the diagnosis and treatment of multiple myeloma. *Haematologica*. 2011 Oct ;96(10):1512-20.

Bao JJ, Zhang WW, Kuo MT. Adenoviral delivery of recombinant DNA into transgenic mice bearing hepatocellular carcinomas. *Hum Gene Ther*1996; 7: 355-365.

Bierer BE, Peterson A, Gorga JC, Herrmann SH, Burakoff SJ. Synergistic T cell activation via the physiological ligands for CD2 and the T cell receptor. *J Exp Med*. 1988 Sep ;168(3):1145-56.

Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009 Jan;10(1):29-37. Epub 2008 Nov 30.

Boles KS, Mathew PA. Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics*. 2001;52(3-4):302-7.

Bottino C, Falco M, Parolini S, Marcenaro E, Augugliaro R, Sivori S, Landi E, Biassoni R, Notarangelo LD, Moretta L, Moretta A. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med*. 2001 Aug 6;194(3):235-46.

Bouchon A, Cella M, Grierson HL, Cohen JI, Colonna M. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol*. 2001 Nov 15;167(10):5517-21.

Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, Barclay AN .2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med*. 1998 Dec 7;188(11):2083-90.

Cao E, Ramagopal UA, Fedorov A, Fedorov E, Yan Q, Lary JW, Cole JL, Nathenson SG, Almo SC. NTB-A receptor crystal structure: insights into homophilic interactions in the signaling lymphocytic activation molecule receptor family. *Immunity*. 2006 Oct; 25(4):559-70.

Calpe S, Erdos E, Liao G, Wang N, Rietdijk S, Simarro M, Scholtz B, Mooney J, Lee CH, Shin MS, Rajnavölgyi E, Schatzle J, Morse HC 3rd, Terhorst C, Lanyi A. Identification and characterization of two related murine genes, *Eat2a* and *Eat2b*, encoding single SH2-domain adapters. *Immunogenetics*. 2006 Feb;58(1):15-25.

Calpe S, Wang N, Romero X, Berger SB, Lanyi A, Engel P, Terhorst C. The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2008; 97 : 177-250.

Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2011 Apr 23; 29:665-705.

Castro AG, Hauser TM, Cocks BG, Abrams J, Zurawski S, Churakova T, Zonin F, Robinson D, Tangye SG, Aversa G, Nichols KE, de Vries JE, Lanier LL, O'Garra A. Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J Immunol.* 1999 Dec 1;163(11):5860-70.

Chan B, Lanyi A, Song HK, Griesbach J, Simarro-Grande M, Poy F, Howie D, Sumegi J, Terhorst C, Eck MJ. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol.* 2003 Feb;5(2):155-60.

Chuang TY, Yu CJ, Shih JY, Yang PC, Kuo SH. Cytologically proven meningeal carcinomatosis in patients with lung cancer: clinical observation of 34 cases. *J Formos Med Assoc.* 2008 Nov;107(11):851-6.

Chen R, Latour S, Shi X, Veillette A. Association between SAP and FynT: Inducible SH3 domain-mediated interaction controlled by engagement of the SLAM receptor. *Mol Cell Biol.* 2006 Aug;26(15):5559-68.

Clarkson NG, Brown MH. Inhibition and activation by CD244 depends on CD2 and phospholipase C-gamma1. *J Biol Chem.* 2009 Sep 11;284(37):24725-34.

Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature.* 1995 Jul 20;376(6537):260-3.

Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, Oohashi T, Howell GR, Bye JM, Cahn AP, Durham J, Heath P, Wray P, Pavitt R, Wilkinson J, Leversha M, Huckle E, Shaw-Smith CJ, Dunham A, Rhodes S, Schuster V, Porta G, Yin L, Serafini P, Sylla B, Zollo M, Franco B, Bolino A, Seri M, Lanyi A, Davis JR, Webster D, Harris A, Lenoir G, de St Basile G, Jones A, Behlradsky BH, Achatz H, Murken J, Fassler R, Sumegi J, Romeo G, Vaudin M, Ross MT, Meindl A, Bentley DR. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):129-35.

Cruz-Munoz ME, Dong Z, Shi X, Zhang S, Veillette A. Influence of CRACC, a SLAM family receptor coupled to the adaptor EAT-2, on natural killer cell function. *Nat Immunol.* 2009 Mar;10(3):297-305. Epub 2009 Jan 18.

Davis SJ, Van Der Merwe PA. The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol Today* 1996; 17: 177-87.

De la Fuente MA, Pizcueta P, Nadal M, Bosch J, Engel P. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood.* 1997 Sep 15;90(6):2398-405.

De la Fuente MA, Tovar V, Villamor N, Zapater N, Pizcueta P, Campo E, Bosch J, Engel P. Molecular characterization and expression of a novel human leukocyte cell-surface marker homologous to mouse Ly-9. *Blood.* 2001 Jun 1; 97(11):3513-20.

Del Valle JM, Pablo E, Martin M. The Cell Surface Expression of SAP-binding receptor CD229 is regulated via its interaction with clathrin-associated adaptor complex 2 (AP-2). *J Biol. Chem* 2003; 278:17430-37.

Detre C, Keszei M, Romero X, Tsokos GC, Terhorst C. SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Semin Immunopathol.* 2010 Jun;32(2):157-71. Epub 2010 Feb 10. Review.

Duan XX, Ou JS, Li Y, Su JJ, Ou C, Yang C, Yue HF, Ban KC. Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4740-4744.

Dong Z, Cruz-Munoz ME, Zhong MC, Chen R, Latour S, Veillette A. Essential function for SAP family adaptors in the surveillance of hematopoietic cells by natural killer cells. *Nat Immunol.* 2009 Sep;10(9):973-80. Epub 2009 Aug 2.

Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, 1993 May 6;363(6424):45-51.

Endt J, Eissmann P, Hoffmann SC, Meinke S, Giese T, Watzl C. Modulation of 2B4 (CD244) activity and regulated SAP expression in human NK cells. *Eur J Immunol.* 2007 Jan;37(1):193-8.

Engel P, Eck MJ, Terhorst C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat Rev Immunol.* 2003 Oct;3(10):813-21. Review.

Elishmereni M, Levi-Schaffer F. CD48: A co-stimulatory receptor of immunity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Jan;43(1):25-8. Epub 2010 Sep 15.

Falco M, Marcenaro E, Romeo E, et al. Homophilic interaction of NTB-A, a member of the CD2 molecular family: induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1663-72.

Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* 2006 Sep;6(9):674-87. Review.

Fennelly JA, Tiwari B, Davis SJ, Evans EJ. CD2F-10: a new member of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics.* 2001 Sep;53(7):599-602.

Flaig RM, Stark S, Watz C. NTB-A activates NK cells via homophilic interaction. *J Immunol* 2004; 172: 6524-7.

Fraser CC, Howie D, Morra M, Qiu Y, Murphy C, Shen Q, Gutierrez-Ramos JC, Coyle A, Kingsbury GA, Terhorst C. Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family. *Immunogenetics.* 2002 Feb;53(10-11):843-50. Epub 2002 Jan 23.

Gao N, Schwartzberg P, Wilder JA, Blazar BR, Yuan D. B cell induction of IL-13 expression in NK cells: role of CD244 and SLAM-associated protein. *J Immunol.* 2006 Mar 1;176(5):2758-64.

Graham DB, Bell MP, McCausland MM, Huntoon CJ, Deursen JV, Faubion WA, Shane Crotty S, McKean DJ. Ly9 (CD229)-Deficient Mice Exhibit T Cell Defects yet Do Not Share Several Phenotypic Characteristics Associated with SLAM- and SAP-Deficient Mice. *J Immunol* 2006;176:291-300.

Henning G, Kraft MS, Derfuss T, Pirzer R, de Saint-Basile G, Aversa G, Fleckenstein B, Meinel E. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 2001 Sep;31(9):2741-50.

Howie D, Okamoto S, Rietdijk S, Clarke K, Wang N, Gullo C, Bruggeman JP, Manning S, Coyle AJ, Greenfield E, Kuchroo V, Terhorst C. The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):2899-907.

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005 Jul 1;121(7):1109-21.

Kingsbury GA, Feeney LA, Nong Y, Calandra SA, Murphy CJ, Corcoran JM, Wang Y, Prabhu Das MR, Busfield SJ, Fraser CC, Villeval JL. Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J Immunol*. 2001 May 1;166(9):5675-80.

Kingsmore SF, Souryal CA, Watson ML, Patel DD, Seldin M. Physical and genetic linkage of the genes encoding Ly-9 and CD48 on mouse and human chromosomes1. *Immunogenetics* 1995;42:59-62.

Korver W, Singh S, Liu S, Zhao X, Yonkovich S, Sweeney A, Anton K, Lomas WE 3rd, Greenwood R, Smith A, Tran DH, Shinkawa P, Jimenez M, Yeung P, Aguilar G, Palencia S, Vatta P, Mueller M, Zhan X, Newton EM, Liu Y, Zhao J, Emtage P, Levy MD, Hsi ED, Funk WD, Abo A. The lymphoid cell surface receptor NTB-A: a novel monoclonal antibody target for leukaemia and lymphoma therapeutics. *Br J Haematol*. 2007 May;137(4):307-18.

Krause SW, Rehli M, Heinz S, Ebner R, Andreesen R. Characterization of MAX.3 antigen, a glycoprotein expressed on mature macrophages, dendritic cells and blood platelets: identity with CD84. *Biochem J*. 2000 Mar 15;346 Pt 3:729-36.

Kruse M, Meinel E, Henning G, Kuhnt C, Berchtold S, Berger T, Schuler G, Steinkasserer A. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol*. 2001 Aug 15;167(4):1989-95.

Latour S, Gish G, Helgason CD, et al. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol* 2001; 2: 681-90.

Latour S, Roncogalli R, Chen R, et al. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signaling in immune regulation. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 149-54.

Latour S, Veillette A. The SAP family of adaptors in immune regulation. *Semin Immunol*. 2004 Dec;16(6):409-19. Review.

Lee KM, McNerney ME, Stepp SE, Mathew PA, Schatzle JD, Bennett M, Kumar V. 2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells. *J Exp Med*. 2004 May 3;199(9):1245-54.

Lee KM, Forman JP, McNerney ME, Stepp S, Kuppireddi S, Guzier D, Latchman YE, Sayegh MH, Yagita H, Park CK, Oh SB, Wülfing C, Schatzle J, Mathew PA, Sharpe AH, Kumar V. Requirement of homotypic NK-cell interactions through 2B4(CD244)/CD48 in the generation of

NK effector functions. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3181-8. Epub 2005 May 19.

Li C, Iosef C, Jia CY, Han VK, Li SS. Dual functional roles for the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP/SH2D1A in signaling through the signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) family of immune receptors. *J Biol Chem*. 2003 Feb 7;278(6):3852-9. (a)

Li C, Iosef C, Jia CY, Gkourasas T, Han VK, Shun-Cheng Li S. Disease-causing SAP mutants are defective in ligand binding and protein folding. *Biochemistry*. 2003 Dec 23;42(50):14885-92. (b)

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362:1907-17.

Llovet JM, Chen Y, Wurmbach E, Roayaie S, Fiel MI, Schwartz M, Thung SN, Khitrov G, Zhang W, Villanueva A, Battiston C, Mazzaferro V, Bruix J, Waxman S, Friedman SL. A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1758-1767.

Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, R. D. *Cell* 1991; 67, 601–616.

Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*, 1992 Aug 7;70(3):431-42.

Ma CS, Nichols KE, Tangye SG Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25: 337-79.

McGlynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005 Feb;19(1):3-23.

Margraf-Schönfeld S, Böhm C, Watzl C. Glycosylation affects ligand binding and function of the activating natural killer cell receptor 2B4 (CD244) protein. *J Biol Chem*. 2011 Jul 8;286(27):24142-9. Epub 2011 May 23.

Matesanz-Isabel J, Sintés J, Llinàs L, de Salort J, Lázaro A, Engel P. New B-cell CD molecules. *Immunol Lett*. 2011 Jan 30;134(2):104-12. Epub 2010 Oct 7.

Mathew PA, Garni-Wagner BA, Land K, Takashima A, Stoneman E, Bennett M, Kumar V. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol*. 1993 Nov 15;151(10):5328-37.

Martin M, Romero X, Angel M et al. CD84 functions as a homophilic adhesion molecule and enhances IFN-gamma secretion: adhesion is mediated by Ig-like domain 1. *J Immunol* 2001; 167: 3668–76.

Martin M, Del Valle JM, Saborit I, Engel P. Identification of Grb2 As a Novel Binding Partner of the Signaling Lymphocyte Activation Molecule-Associated Protein Binding Receptor CD229. *J Immunol* 2005; 174; 5977-86.

Mikhalap SV, Shlapatska LM, Berdova AG, Law CL, Clark EA, Sidorenko SP. CDw150 associates with src-homology 2-containing inositol phosphatase and modulates CD95-mediated

apoptosis. *J Immunol.* 1999 May 15;162(10):5719-27.

Morra M, Howie D, Grande MS, Sayos J, Wang N, Wu C, Engel P, Terhorst C. X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:657-82.

Morra M, Lu J, Poy F, Martin M, Sayos J, Calpe S, Gullo C, Howie D, Rietdijk S, Thompson A, Coyle AJ, Denny C, Yaffe MB, Engel P, Eck MJ, Terhorst C. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.* 2001 Nov 1;20(21):5840-52.

Munitz A, Bachelet I, Fraenkel S, Katz G, Mandelboim O, Simon HU, Moretta L, Colonna M, Levi-Schaffer F. 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils. *J Immunol.* 2005 Jan 1;174(1):110-8.

Nanda N, Andre P, Bao M, Clauser K, Deguzman F, Howie D, Conley PB, Terhorst C, Phillips DR. Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood.* 2005 Nov 1;106(9):3028-34. Epub 2005 Jul 21.

Nichols KE, Harkin DP, Levitz S, Krainer M, Kolquist KA, Genovese C, Bernard A, Ferguson M, Zuo L, Snyder E, Buckler AJ, Wise C, Ashley J, Lovett M, Valentine MB, Look AT, Gerald W, Housman DE, Haber DA. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13765-70.

Ohno H. Physiological roles of clathrin adaptor AP complexes: lessons from mutant animals. *J Biochem.* 2006 Jun;139(6):943-8.

Parolini S, Bottino C, Falco M, Augugliaro R, Giliani S, Franceschini R, Ochs HD, Wolf H, Bonnefoy JY, Biassoni R, Moretta L, Notarangelo LD, Moretta A. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med.* 2000 Aug 7;192(3):337-46.

Peers F, Bosch X, Kaldor J, Linsell A, Pluijmen M. Aflatoxin exposure, hepatitis B virus infection and liver cancer in Swaziland. *Int J Cancer.* 1987 May 15; 39(5):545-53.

Punnonen J, Cocks BG, Carballido JM, Bennett B, Peterson D, Aversa G, de Vries JE. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med.* 1997 Mar 17;185(6):993-1004.

Quiroga MF, Jurado JO, Martínez GJ, Pasquinelli V, Musella RM, Abbate E, Issekutz AC, Bracco MM, Malbran A, Sieling PA, Chuluyan E, García VE. Cross-talk between CD31 and the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein during interferon- gamma production against Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis.* 2007 Nov 1;196(9):1369-78. Epub 2007 Sep 26.

Rehermann B, Nascimbeni M, Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Rev Immunol* 2005; 5: 215–29.

Romero X., Benitez D., March S., Vilella R., Miralpeix M., Engel P. Differential expression of SAP and EAT-2-binding leukocyte cell-surface molecules CD84, CD150 (SLAM), CD229 (Ly9) and CD244 (2B4). *Tissue Antigens* 2004; 64, 132-144.

Romero X, Zapater N, Calvo M, et al. CD229 (Ly9) lymphocyte cell surface receptor interacts homophilically through its N-terminal domain and relocalizes to the immunological synapse, *J Immunol* 2005; 174: 7033-42.

Roncagalli R, Taylor JE, Zhang S, Shi X, Chen R, Cruz-Munoz ME, Yin L, Latour S, Veillette A. Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol*. 2005 Oct;6(10):1002-10. Epub 2005 Aug 28.

Sandrin MS, Henning MM, Lo MF, et al. Isolation and characterization of cDNA clones for Humly9: the human homologue of mouse Ly9, *Immunogenetics* 1996; 43: 13-9.

Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, van Schaik S, Notarangelo L, Geha R, Roncarolo MG, Oettgen H, De Vries JE, Aversa G, Terhorst C. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*. 1998 Oct 1;395(6701):462-9.

Sayre PH, Hussey RE, Chang HC, Ciardelli DL, Reinherz EL. Structural and binding analysis of a two domain extracellular CD2 molecule. *J. Exp. Med.* 1989; 169 : 995-1009.

Shlapatska LM, Mikhalap SV, Berdova AG, Zelensky OM, Yun TJ, Nichols KE, Clark EA, Sidorenko SP. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol*. 2001 May 1;166(9):5480-7.

Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jan; 9(1):39-46.

Sidorenko SP, Clark EA. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol*. 2003 Jan;4(1):19-24. Review

Simarro M, Lanyi A, Howie D, Poy F, Bruggeman J, Choi M, Sumegi J, Eck MJ, Terhorst C. SAP increases FynT kinase activity and is required for phosphorylation of SLAM and Ly9. *Int Immunol*. 2004 May;16(5):727-36.

Sintes J, Vidal-Laliena M, Romero X, Tovar V, Engel P. Characterization of mouse CD229 (Ly9), a leukocyte cell surface molecule of the CD150 (SLAM) family. *Tissue Antigens*. 2007 Nov;70(5):355-62.

Sintes J, Romero X, Marin P, Terhorst C, Engel P. Differential expression of CD150 (SLAM) family receptors by human hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol*. 2008 Sep;36(9):1199-204. Epub 2008 May 20.

Speiser DE, Colonna M, Ayyoub M, Cella M, Pittet MJ, Batard P, Valmori D, Guillaume P, Liénard D, Cerottini JC, Romero P. The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8+ effector alpha beta T cells. *J Immunol*. 2001 Dec 1;167(11):6165-70.

Tanaka S, Arai S. Molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2009 Jan;100(1):1-8. Epub 2008 Nov 25.

Tangye SG, Lazetic S, Woollatt E, Sutherland GR, Lanier LL, Phillips JH. Cutting edge: human 2B4, an activating NK cell receptor, recruits the protein tyrosine phosphatase SHP-2 and the adaptor signaling protein SAP. *J Immunol.* 1999 Jun 15;162(12):6981-5.

Tangye SG, Cherwinski H, Lanier LL, Phillips JH. 2B4-mediated activation of human natural killer cells. *Mol Immunol.* 2000 Jun;37(9):493-501.

Tangye SG, Nichols KE, Hare NJ, van de Weerd BC. Functional requirements for interactions between CD84 and Src homology 2 domain-containing proteins and their contribution to human T cell activation. *J Immunol.* 2003 Sep 1;171(5):2485-95.

Tassi I, Colonna M. The cytotoxicity receptor CRACC (CS-1) recruits EAT-2 and activates the PI3K and phospholipase C-gamma signaling pathways in human NK cells. *J Immunol.* 2005 Dec 15;175(12):7996-8002.

Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 2000 Aug 24;406(6798):893-7.

Thésaurus National de Cancérologie Digestive Version: 23/09/2010. <http://www.tncd.org/>

Thompson AD, Braun BS, Arvand A, Stewart SD, May WA, Chen E, Korenberg J, Denny C. EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene.* 1996 Dec 19;13(12):2649-58.

Thorley-Lawson DA, Israelsohn ES. Generation of specific cytotoxic T cells with a fragment of the Epstein-Barr virus-encoded p63/latent membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Aug;84(15):5384-8.

Thorley-Lawson DA. Immunological responses to Epstein-Barr virus infection and the pathogenesis of EBV-induced diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Feb;948(3):263-86.

Tovar V, del Valle J, Zapater N, Martin M, Romero X, Pizcueta P, Bosch J, Terhorst C, Engel P. Mouse novel Ly9: a new member of the expanding CD150 (SLAM) family of leukocyte cell-surface receptors. *Immunogenetics.* 2002 Sep;54(6):394-402. Epub 2002 Jul 18.

Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S, Tiefenbacher R, Purchio AF, Bursch W, Schulte-Hermann R. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5408-5412.

Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol.* 2006 Jan;6(1):56-66. Review.

Veillette A, Cruz-Munoz ME, Zhong MC. SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising. *Trends Immunol.* 2006 May; 27(5):228-34. (a)

Veillette A. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Immunol Rev.* 2006 Dec;214:22-34. Review.

Veillette A, Dong Z, Latour S. Consequence of the SLAM-SAP signaling pathway in innate-like and conventional lymphocytes. *Immunity.* 2007 Nov;27 (5):698-710.

Veillette A. SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold*

Spring Harb Perspect Biol. 2010 Mar; 2(3):a002469. Review.

Velikovskiy CA, Deng L, Chlewicki LK, Fernández MM, Kumar V, Mariuzza RA. Structure of natural killer receptor 2B4 bound to CD48 reveals basis for heterophilic recognition in signaling lymphocyte activation molecule family. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):572-84.

Wang N, Morra M, Wu C, Gullo C, Howie D, Coyle T, Engel P, Terhorst C. CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. *Immunogenetics*. 2001 Jul;53(5):382-94.

Wong YW, Williams AF, Kingsmore SF, Seldin MF. Structure, expression, and genetic linkage of the mouse BCM1 (OX45 or Blast-1) antigen. Evidence for genetic duplication giving rise to the BCM1 region on mouse chromosome 1 and the CD2/LFA3 region on mouse chromosome 3. *J Exp Med*. 1990 Jun 1;171(6):2115-30.

Yan Q, Malashkevich VN, Fedorov A, Fedorov E, Cao E, Lary JW, Cole JL, Nathenson SG, Almo SC. Structure of CD84 provides insight into SLAM family function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 19;104(25):10583-8