

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**Identification de nouveaux membres de la famille
6 des glycosyltransférases (GT6)
et rôle d'un membre de cette famille
dans la synthèse du ligand des lymphocytes NK_{Ti}**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Glycobiologie et Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Anne-Laure TURCOT-DUBOIS

le 23 Octobre 2006, devant le jury ci-dessous

Président : **Mr Charles TELLIER**, Professeur, CNRS, Nantes.

Rapporteurs : **Me Liliane GATTEGNO**, Professeur, Bobigny.
 Mr Philippe DELANNOY, Professeur, CNRS, Lille.

Examineurs : **Mr Charles TELLIER**, Professeur, CNRS, Nantes.
 Mr Marc BONNEVILLE, Directeur de recherche,
CNRS, Nantes.

Directeur de thèse :

Mr Jacques LE PENDU, Directeur de recherche, INSERM, Nantes.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARNm : Acide ribonucléique messenger

β2m : bêta 2 microglobuline

CD: Cluster of Differentiation

CD1d : Cluster de Différenciation 1 d

Cellules DP : Cellules Double Positive

COS : CV1 Origin defective SV40

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

DC : Cellule dendritique

EBV : Epstein Barr Virus

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FITC : Fluoresceine isothiocyanate

Fuc : Fucose

Gal : Galactose

GalNAc : N-acétylgalactosamine

Gapdh: Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase

GD3 : trisialoganglioside

Glc : Glucose

GlcNAc : N-acétylglucosamine

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony stimulating Factor

GT6 : Glycosyltransférase famille 6

GS1-B4 : *Griffonia simplicifolia* isolectine B4

IFNγ : Interféron gamma

FTB : Fucosyltransférase B

KRN7000 : (2S,3S,4R)-1-O-(alpha-D-galactopyranosyl)-2-5N-hexacosanoylamino)-1,3,4-octadecanetriol

LBR: Ligand Binding Region

LPS: Lipopolysaccharide

MCA : Méthylchlorantrène

NK_Ti : Natural Killer T cells

NOD : Non Obese Diabetic

pb: paire de bases

PBL : Peripheral Blood Lymphocytes

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS: Phosphate Buffered Saline Sodium

PCR: Polymerase Chain Reaction

PIM₄: Phosphatidylinositol-tétramannoside

PPMP: D,L-thréo-1-phényl-2-hexadécanolamino-3-morpholino-1-propanol

RE : Reticulum Endoplasmique

SAP : Serum Amyloid Protein

siRNA : Small interference ARN

Souris SJL : souris Sélectionnées par James Lambert

SVF: Sérum de veau fœtal

TCR : T Cell Receptor

TRAIL : TNF- Related Apoptosis Inducing Ligand

VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

VRS : Virus Respiratoire Syncytial

Préambule

Introduction

I- <u>Les Glycoconjugués</u>	2
A- Les Glycolipides	2
B- Les Glycoprotéines	3
1- Les glycannes N-liés	3
2- Les glycannes O-liés	5
II- <u>Les Glycosyltransférases</u>	7
A- Caractéristiques communes	7
B- Classification des glycosyltransférases	8
1- Classification de Campbell	8
2- Classification CAZy	9
C- Les α 1,3-galactosyltransférases (famille GT6)	10
1- Caractéristiques communes	10
2- Identification des différents membres de la famille	12
a/ Les glycosyltransférases A et B	12
b/ L' α 1,3galactosyltransférase	20
c/ La Forssman synthase	24
d/ L'isoglobotrihexosylcéramide synthase	25
3- Structure des membres de la famille GT6	26
a/ Les glycosyltransférases A et B	27
b/ L' α 1,3 galactosyltransférase	29
c/ Motifs protéiques conservés dans la famille GT6	30
d/ Caractéristiques des membres de la famille GT6	33
D- Fonctions physiologiques des antigènes synthétisés par les enzymes de la famille GT6	33
E- Antigènes synthétisés par les enzymes de la famille GT6 et pathologies	35
1- Infections par des microorganismes	35
a/ Infections bactériennes	35
b/ Infections parasitaires	37
2- Infections virales	37
3- Maladies non infectieuses	38
a/ Maladies pulmonaires	38
b/ Maladies cardio-vasculaires	38

c/ Maladies du foie	39
d/ Maladies auto-immunes	39
4- Xénogreffes	40
5- Cancer	40
a/ Perte d'expression des antigènes ABH	42
b/ Néoexpression des antigènes ABH	42
c/ Expression incompatible des antigènes ABH	43
III- <u>Reconnaissance des glycolipides par une population particulière de lymphocytes : les NKTi</u>	43
A- Présentation des NKTi	44
1- Reconnaissance d'un glycolipide dans le contexte du CD1d	44
a/ CD1d : molécule présentatrice d'antigènes glycolipidiques	44
b/ Les ligands des cellules NKTi	47
2- Interaction des NKTi avec le glycolipide	49
a/ Caractéristiques phénotypiques des NKTi	49
b/ Interaction du TCR avec le complexe CD1d-glycolipide	50
B- Physiologie des NKTi	51
1- Développement intrathymique	51
2- Localisation cellulaire, fréquence et recrutement	52
3- Activation et fonctions effectrices	53
a/ Profil d'expression cytokinique et activité cytotoxique	53
b/ Implication dans la balance Th1 et Th2	54
c/ Interaction avec d'autres types cellulaires	54
4- Devenir des NKTi après activation	55
C- NKTi et pathologies	56
1- NKTi et infections bactériennes	56
2- NKTi et infections virales	58
3- NKTi et infections parasitaires	59
4- NKTi et autoimmunité	59
5- NKTi et cancer	60
a/ Chez la souris	60
b/ Chez l'Homme	62

Partie I : Identification de nouveaux membres de la famille GT6

<u>I- Présentation de l'étude</u>	64
A- Antigènes A et B incompatibles dans les cancers	64
B- Présentation de la famille GT6 chez le rat	65
<u>II- But de l'étude et résultats</u>	68
A- Article 1	70
B- Article 2	82
<u>III- Conclusions et perspectives</u>	125

Partie II : L'iGb3, ligand naturel des NKTi humains ?

MATERIEL ET METHODES

<u>I- Lignées cellulaires</u>	128
A- Lignées établies	128
B- Cellules NKTi	129
C- Cellules dendritiques	130
<u>II- Analyses par cytométrie en flux</u>	131
A- Marquage des cellules	131
B- Inhibition de la fixation de GS1-B4 avec du Gal libre	132
<u>III- Clivage des galactoses terminaux sur les cellules</u>	133
<u>IV- Inhibition de la synthèse des glycolipides</u>	133
<u>V- Tests fonctionnels</u>	134
A- Test de cytotoxicité à médiation cellulaire	135
B- Test de la production de cytokines par les NKTi	135
1- Production de cytokines dans le surnageant par les NKTi	135
2- Dosage du TNF- α	135
3- Dosage de l'IL-4 et de l'IFN- γ	136
<u>VI- Immunohistochimie</u>	137
<u>VII- Etude de l'iGb3 synthase humaine</u>	137
A- Préparation de l'ADNc	137
B- Détection de l'iGb3 synthase humaine dans les lignées	139
C- Amplifications des exons de l'iGb3 synthase	139
<u>VII- L'interférence à ARN</u>	140
A- Préparation des siRNA	140

B- Contrôle de l'efficacité des siRNA	142
C- Production de lentivirus	144
D- Titration des particules virales et infection des cellules	145
VII- Induction de l'expression de CD1d	146
A- Transfection plasmidique dans les HEK293	146
B- Infection lentivirale dans les Namalwa	147
RESULTATS	
I- Un ligand endogène des NKTi ?	150
A- Interaction des NKTi avec des cellules tumorales	155
1- Identification de lignées tumorales, cibles potentielles des NKTi	155
a/ Les cellules HeLa	155
b/ Les cellules HEK293	169
c/ Les cellules Namalwa	171
d/ Les cellules HD Mar	172
e/ Autres lignées tumorales	173
f/ Bilan des cellules utilisées dans notre étude des NKTi	174
2- Etude de l'interaction des NKTi avec des lignées tumorales	175
B- Interaction des NKTi avec les cellules dendritiques	181
1- Production et caractérisation des cellules dendritiques	181
2- Etude de l'interaction des NKTi avec les cellules dendritiques	185
II- Existe-t-il une population lymphocytaire humaine spécifique de l'iGb3 ?	187
A- Reconnaissance de l'iGb3 chargé sur des cellules cibles	187
B- Inhibition de la reconnaissance des HeLa-CD1d par les NKTi	190
III- Autres ligands pour les cellules NKTi	191
A- Agonistes synthétiques	192
B- Glycolipides marins	193
C- Un autre ligand endogène, le Gb3 ?	195

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Discussion générale

Bibliographie

Les glycosyltransférases sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques. Elles sont regroupées en familles définies selon leur spécificité et la conformation du glucide transféré. Les groupes sanguins A, B et O ont été identifiés en 1901 par Karl Landsteiner et ont fait l'objet de nombreuses études vue leur importance lors de transfusions sanguines. Les individus de groupe O n'expriment pas les antigènes A et B du fait de la présence d'une mutation inactivante au niveau du gène codant les glycosyltransférases A et B, respectivement responsables de la synthèse des antigènes A et B. Ces enzymes appartiennent à la famille 6 des glycosyltransférases (GT6) dont plusieurs autres membres sont connus : l' α 1,3-galactosyltransférase, responsable de la synthèse du xénoantigène α 3Gal ; la Forssman synthase et l'iGb3 synthase.

Dans la première partie de ma thèse, je me suis intéressée à l'expression incompatible des antigènes de groupe sanguin A et B dans des carcinomes d'individus de phénotype O. Le mécanisme permettant la synthèse de ces néo-antigènes n'est pas connu. Des travaux antérieurs dans notre équipe ont montré une expression tissulaire différentielle des antigènes A et B chez le rat, contrairement à ce qui est observé chez l'Homme. Nous avons émis l'hypothèse qu'il existerait plusieurs gènes *Abo* ou apparentés *Abo* chez le rat pour expliquer cette expression différentielle d'antigènes A et B. Des gènes orthologues humains pourraient être impliqués dans la synthèse des antigènes A ou B incompatibles dans les tumeurs. Une étude de la famille GT6 chez le rat a donc été réalisée.

Dans un deuxième temps, l'étude de l'expression et du rôle potentiel de l'iGb3 chez l'Homme sera présentée. En effet, cet antigène a été récemment identifié comme un ligand endogène des lymphocytes NKTi murins mais aucune étude chez l'Homme n'a été conduite à ce jour. Nous avons cherché à examiner la possibilité que ce glycolipide constituerait un antigène tumoral reconnu par ces lymphocytes non conventionnels ainsi qu'un ligand endogène présenté par les cellules dendritiques aux NKTi humains.

I- Les Glycoconjugués

Le glycome a été récemment défini au côté du génome et du protéome (Hirabayashi et al., 2001). Il s'agit de l'ensemble des chaînes de glucides, ou glycannes, portées par des lipides et des protéines que synthétise l'organisme. Le nombre d'isoformes que peut porter une seule glycoprotéine est énorme, de sorte que la taille du glycome est parfois de 10 à 10^4 fois plus grande que la taille du protéome selon les espèces (Raman et al., 2005). Les glycannes ont été impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques mais la ou les fonctions de beaucoup d'entre eux restent à préciser ou à définir.

Les glycannes sont formés par l'addition séquentielle de monosaccharides spécifiques sur des précurseurs. On distingue deux grands groupes : les glycolipides et les glycoprotéines.

C- Les Glycolipides

Chez les mammifères, les glycolipides sont des glycosphingolipides. Ils se composent d'une partie céramide et d'une partie glycosidique (Figure 1).

Partie glycosidique

Céramide

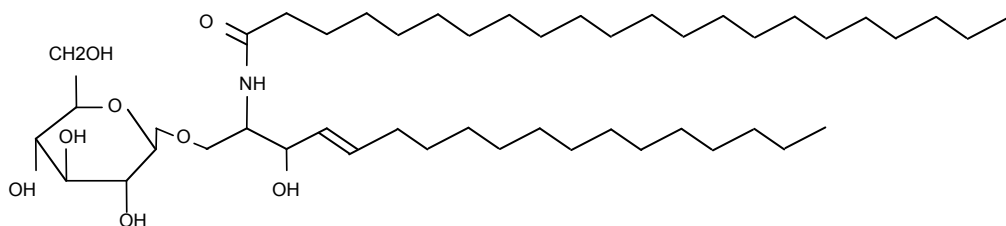


Figure 1 : Formule simplifiée d'un glycosphingolipide (glucosylcéramide) comportant un groupement de type céramide et un résidu glucidique.

La partie céramide dérive d'un amino-alcool, la sphingosine, sur laquelle sont branchés un acide gras par une liaison amine et un mono ou un oligosaccharide par une liaison glycosidique. La synthèse des céramides se déroule au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Les chaînes oligosaccharidiques sont ensuite synthétisées au niveau

de l'appareil de Golgi, par l'action séquentielle de glycosyltransférases (Sandhoff et al., 1992; Trinchera et al., 1991).

On peut distinguer cinq familles de glycosphingolipides : les ganglio, globo, isoglobo, lacto et néolactocéramides (Figure 2).

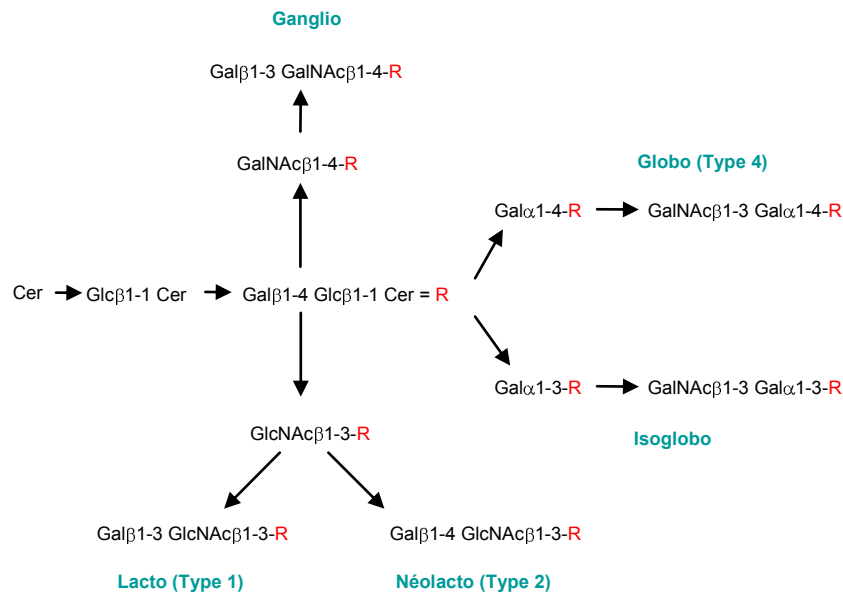


Figure 2 : Voies de synthèse des différentes familles de glycosphingolipides.

D- Les Glycoprotéines

On distingue deux familles de glycoprotéines, selon le type de liaison entre le glucide et le corps protéique:

- les glycannes N-liés, où la structure oligosaccharidique est attachée par un résidu N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le groupement aminé d'une asparagine de la chaîne protéique.
- les glycannes O-liés, dont les mucines, qui sont liés au groupement OH d'une sérine ou thréonine du peptide.

1- Les glycannes N-liés

La N-glycosylation est largement impliquée dans la physiologie des protéines : adressage des protéines lysosomales par un signal mannose-6-phosphate, qualité de

repliement des protéines, interaction avec les lectines de pathogènes pour n'en citer que quelques unes (Mouricout, 1997; Trombetta and Helenius, 1998; Varki and Kornfeld, 1980).

Les N glycannes possèdent un corps trimannosylé commun. On distingue trois sous groupes selon les résidus glycaniques additionnés (Figure 3):

- type oligomannosidique, où seuls des résidus mannose s'ajoutent au corps commun.
- type complexe ou N-acétyllactosaminique, où on ne trouve aucun autre mannose que ceux du corps commun. Les antennes oligosaccharidiques branchées sur le corps commun sont initiées par l'action de quatre glycosyltransférases chez les mammifères (GnT I, II, IV et V) pour former des structures bi, tri ou tétra-antennées. Ces antennes peuvent être allongées par l'addition de résidus galactose (Gal), GlcNAc, fucose (Fuc), acide neuraminique (NeuAc), sulfate ou encore par l'accrochage d'unités répétitives (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3).
- type hybride, où les deux types de structures précédents sont présents.

Les glycannes oligomannosidiques et hybrides peuvent subir l'action de la glycosyltransférase GnT III sur le mannose du corps commun en β . Les N-glycannes présentent une grande variété structurale, due au nombre d'antennes variables qui se greffent sur le corps trimannosylé, aux différents types de liaisons et aux différents résidus glucidiques constituant ces antennes.

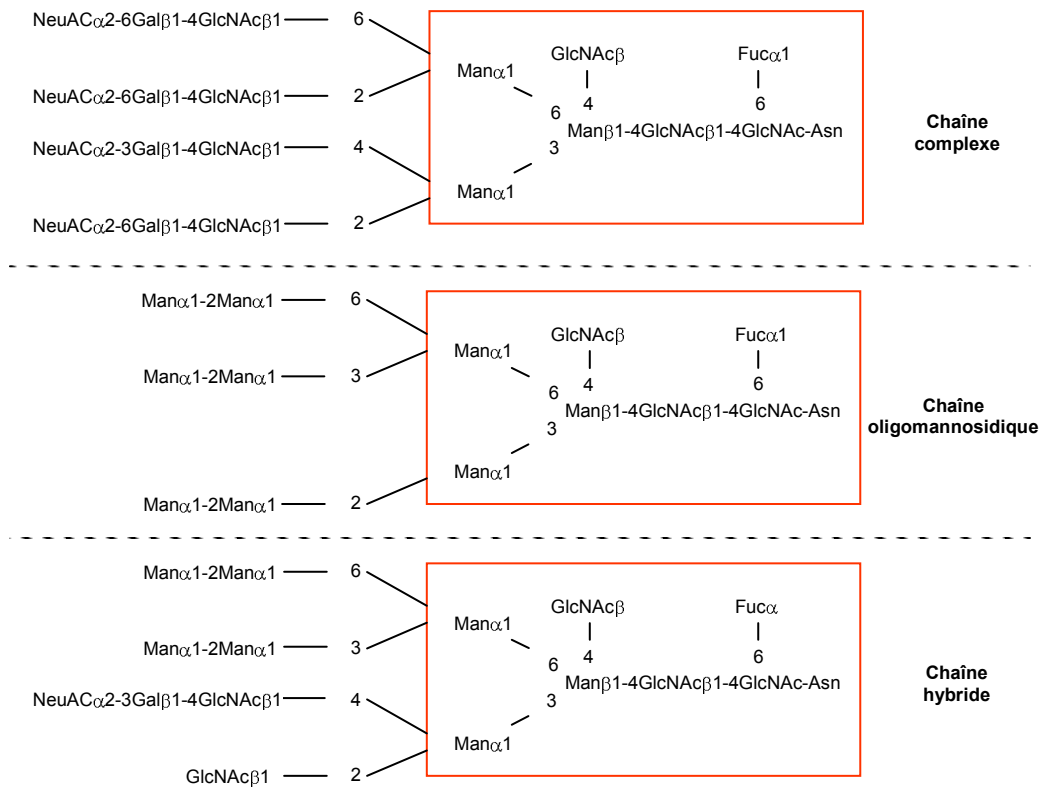


Figure 3 : Les trois sous-groupes de chaînes N-liées. La structure encadrée représente le corps commun de tous les N-glycannes (à l'exception du résidu fucose et du résidu GlcNAc en β 4 sur le mannose du corps commun). Les structures à l'extérieur de ces lignes peuvent varier.

Les différentes étapes de la synthèse des N-glycannes ont lieu dans des compartiments cellulaires bien définis. La synthèse des N-glycannes débute par le transfert d'un bloc tétradécasaccharide sur un résidu asparagine qui doit être au sein d'un triplet consensus Asn-X-Thr/Ser où X représente n'importe quel acide aminé sauf la proline. L'accrochage puis l'élagage de l'oligosaccharide primaire s'effectuent dans le réticulum endoplasmique et le cis Golgi, l'initiation des antennes a lieu dans le Golgi médian et la terminaison des chaînes dans le trans Golgi.

2- Les glycannes O-liés

Les polysaccharides O-liés présentent des différences majeures par rapport aux N-glycannes. Le premier résidu O-lié sur le squelette peptidique peut-être un Fuc, un GlcNAc ou

un mannose (Peter-Katalinic, 2005). Cependant, le plus fréquemment rencontré, caractéristique des glycanes de type mucine, est un GalNAc. Le transfert des résidus glucidiques lors de la synthèse est séquentiel. Des formes variées de O-glycanes de type mucines sont identifiées :

- monosaccharidiques comme l'antigène Tn (GalNAc α -Ser/Thr).
- disaccharidiques comme les antigènes sialyl-Tn et T
- formes glycaniques plus complexes caractérisées par la présence de huit cœurs distincts (Hounsell et al., 1996; Yamashita et al., 1995) (Tableau 1).

Coeur	Séquence
1	Gal β 1-3GalNAc
2	GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc
3	GlcNAc β 1-3 GalNAc
4	GlcNAc β 1-6 (GlcNAc β 1-3) GalNAc
5	GalNAc α 1-3 GalNAc
6	GlcNAc β 1-6 GalNAc
7	GalNAc α 1-6 GalNAc
8	Gal α 1-3 GalNAc

Tableau 1 : Structure des huit cœurs de O-glycanes complexes de type mucine.

La O-glycosylation est uniquement post-traductionnelle et se déroule dans le Golgi. La première étape de la synthèse est le plus souvent un transfert de GalNAc sur une sérine ou une thréonine. Il n'existe pas de motif peptidique caractéristique des sites de fixation de O glycanes. Les structures secondaires ou tertiaires semblent importantes dans des régions peptidiques riches en Ser, Thr et Pro (Julenius et al., 2005).

II- Les Glycosyltransférases

E- Caractéristiques communes

Il existe des centaines de glycosyltransférases permettant la synthèse de chaînes glucidiques sur des glycolipides ou des glycoprotéines. Chez l'Homme, 250 gènes codant pour des glycosyltransférases ont été identifiés. Ces enzymes partagent un certain nombre de caractéristiques.

Les glycosyltransférases du réticulum endoplasmique possèdent plusieurs domaines transmembranaires (Oriol et al., 2002). Au contraire, les glycosyltransférases golgiennes sont des protéines de type II : domaine N terminal cytoplasmique court, domaine d'ancrage transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés, tige flexible et domaine catalytique COOH terminal (Figure 4). Le domaine d'ancrage oriente le domaine catalytique dans la lumière du réticulum endoplasmique ou du Golgi. L'action de protéases au niveau d'un site de clivage peut permettre le relargage de ces enzymes dans la salive, le plasma ou le lait maternel.

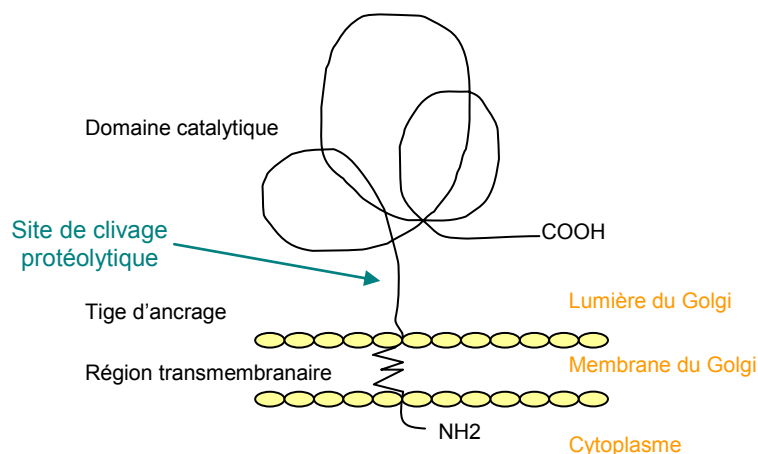


Figure 4 : Représentation schématique d'une glycosyltransférase insérée dans la membrane du Golgi.

Les gènes codant pour ces enzymes présentent deux types d'organisations : mono ou poly-exonique. Les glycosyltransférases sont regroupées en famille sur la base d'une même spécificité osidique (β 1,4-galactosyltransférases, α 1,3-galactosyltransférases, par exemple).

Dans une même famille, l'homologie de séquence entre différentes espèces est importante. En revanche, il n'y a pas ou peu d'homologie de séquences entre des gènes codant pour des glycosyltransférases de familles distinctes.

La régulation de l'expression des glycosyltransférases semble se faire essentiellement au niveau de la transcription. Une régulation s'exerce également au niveau post-transcriptionnel, par une stabilité variable de l'ARN messager, ainsi que par sa traduction plus ou moins efficace.

F- Classification des glycosyltransférases

Il existe de nombreuses glycosyltransférases. Cette variété d'enzymes tant au niveau de leurs caractéristiques enzymatiques, structurales que biochimiques nécessite un classement clair. Au cours de ces dernières années, différents modèles de classement ont été proposés.

L'attribution d'un numéro EC (Enzyme Commission) suivant la nomenclature de l'IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) a permis de définir six familles, de EC1 à EC6, dans l'ordre : oxidoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases. Par la suite, d'autres modes de classement des enzymes ont été établis.

1- Classification de Campbell

Un autre mode de classification des glycosyltransférases a été proposé par Campbell et ses collaborateurs en 1997 (Campbell et al., 1997). Il est basé sur la similarité en acides aminés entre les différentes glycosyltransférases et s'inspire du classement des hydrolases glycosidiques. Vingt sept familles ont été définies, regroupant 600 séquences. Cependant, l'essor de la bioinformatique a permis l'identification de nombreuses séquences par homologie avec les enzymes déjà identifiées. Un classement basé uniquement sur la similarité en acides aminés ne permet pas le classement de toutes ces nouvelles séquences.

2- Classification CAZy

En 2003, Coutinho et ses collaborateurs proposent un nouveau mode de classification des glycosyltransférases, disponible sur le web : la base de données CAZy (Carbohydrate Active enZYmes - <http://www.afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Cette classification regroupe les glycosyltransférases permettant une O-glycosylation et libérant une molécule phosphorylée, à partir d'un donneur activé. Elle prend en compte toutes les glycosyltransférases, quelque soit la spécificité de donneur ou d'accepteur (Coutinho et al., 2003). Les critères de classement de ces enzymes sont :

- la spécificité de donneur ou d'accepteur. Une famille peut comprendre des enzymes avec des spécificités différentes. On parle dans ce cas là de famille polyspécifique.
- le mécanisme moléculaire, « retaining » ou « inverting », par lequel l'enzyme greffe le glucide sur l'accepteur.
- l'homologie au niveau des acides aminés entre les différentes séquences lors de l'analyse bioinformatique.
- l'organisation structurale, en feuillets
- le domaine catalytique de l'enzyme
- la modularité

Lors de sa création, la base de données CAZy comportait 65 familles de glycosyltransférases. Actuellement, 82 familles, nommées GT1 à 82 (environ 18500 séquences) composent cette base de données et 127 séquences ne sont encore classées dans aucune famille. Les familles GT 1 à 27 sont celles définies précédemment par Campbell. Le classement des enzymes se fait par hiérarchisation. Les glycosyltransférases sont divisées en 4 clans, selon qu'elles inversent ou conservent la conformation anomérique du glucide donneur, et selon leur organisation structurale (Tableau 2). Deux organisations structurales ont été décrites dans la base de données : feuillet A ou B. Le feuillet A a été défini suite à l'identification de la protéine SpsA chez *Bacillus subtilis* (famille GT2). Le feuillet B a été défini d'après l'organisation de la glycosyltransférase β du phage T4, et du domaine catalytique de la phosphorylase du glycogène.

	Mécanisme moléculaire	Organisation structurale
Clan I	inverting	feuillet A
Clan II	inverting	feuillet B
Clan III	retaining	feuillet A
Clan IV	retaining	feuillet B

Tableau 2 : Les clans des glycosyltransférases dans la base de données CAZy.

La base de données CAZy permet donc de classer les glycosyltransférases sans que la caractérisation complète de l'enzyme soit nécessaire. Les séquences identifiées suite à une analyse bioinformatique peuvent être regroupées dans une famille même si leur activité enzymatique n'est pas identifiée. De plus, la définition des familles répond à des critères plus stringents que ceux de la classification de Campbell. Ceci permet de restreindre la possibilité d'action de ces enzymes. Cependant, dans la classification CAZy, il existe des familles polyspécifiques. Donc, on ne peut pas prédire les caractéristiques enzymatiques d'une glycosyltransférase, uniquement par sa séquence ou par son appartenance à telle ou telle famille.

La base de données CAZy est régulièrement mise à jour, elle n'est cependant pas exhaustive. Elle regroupe les glycosyltransférases en familles et offre un état des lieux de l'identification des glycosyltransférases dans différentes espèces. La classification CAZy offre les outils pour une analyse détaillée d'une famille donnée de glycosyltransférase.

Dans la suite de ce travail, nous nous intéresserons particulièrement aux antigènes de groupes sanguins tissulaires, soit les antigènes ABH et apparentés, et donc à la famille des glycosyltransférases GT6 qui contribuent à leur synthèse.

G- Les α 1,3-galactosyltransférases (famille GT6)

1- Caractéristiques communes

La famille GT6 définie par le classement CAZY se compose de 83 membres, identifiés dans 33 espèces différentes. Ce sont des protéines transmembranaires de type II, organisées en

feuillet de type GTA. Elle utilisent un donneur activé de type UDP-glucide, et conservent la conformation anomérique du glucide accepteur après transfert. Quatre activités ont été identifiées dans cette famille et quatre numéros EC leurs ont été attribuées : α 1,3-galactosyltransférase (EC [2.4.1.87](#)); α 1,3-*N*-acétylgalactosaminyltransférase (EC [2.4.1.40](#)); α galactosyltransférase (EC [2.4.1.37](#)); globoside α -*N*-acétylgalactosaminyltransférase (EC [2.4.1.88](#)).

Les membres connus de cette famille sont :

- Les glycosyltransférases A et B.
- L' α 1,3-galactosyltransférase (α 3GalT).
- La Forssman synthase.
- L'iGb3 synthase.

Les voies de synthèse des produits des glycosyltransférases de la famille GT6 sont représentés dans la figure 5.

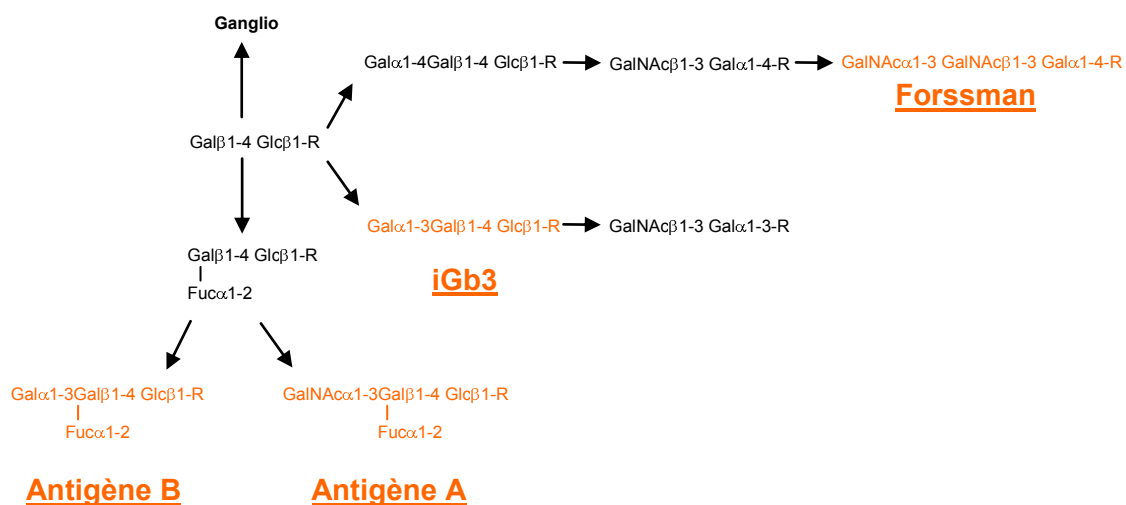


Figure 5 : Synthèse des antigènes par les glycosyltransférases de la famille GT6. R : radical glycoprotéique ou glycolipidique. Le xénoantigène est synthétisé par l' α 1,3-galactosyltransférase sur le Galβ1,4GlcNAcβ1-R.

2- Identification des différents membres de la famille

a/ Les glycosyltransférases A et B

- Identification

Les groupes sanguins ont été identifiés en 1901 par Karl Landsteiner après le constat que les globules rouges de différents individus n'avaient pas le même profil d'héماغglutination. Ce système est défini par la loi de Landsteiner selon la présence des antigènes de groupe sanguins ou des anticorps correspondants chez les individus.

Groupe sanguin	Anticorps naturels
A	Anti-B
B	Anti-A
AB	-
O	Anti-A et Anti-B

Tableau 3 : Loi de Landsteiner : les individus n'ayant pas l'antigène A et/ou B possèdent les anticorps sériques anti-A et/ou anti-B respectivement dirigés contre ces antigènes.

Après identification des différents groupes sanguins par Landsteiner, Watkins et Morgan déterminent la structure chimique des antigènes ABH dans les années 50. Les antigènes de groupe sanguins sont des oligosaccharides, portés par des glycolipides ou des glycoprotéines. Après une première identification sur des globules rouges, ils ont été caractérisés sur des tissus et dans des sécrétions. On parle donc d'antigènes de groupe sanguin tissulaires. La compatibilité entre ces groupes sanguins est importante non seulement pour les transfusions sanguines, mais aussi lors de greffes d'organes.

En 1924, Bernstein propose le modèle un locus/trois allèles pour expliquer le polymorphisme ABO entre les individus. Six génotypes du locus *ABO* seraient responsables des quatre phénotypes identifiés chez les individus. Le caractère O étant récessif par rapport à A ou B. En 1959, Watkins et Morgan d'une part, et Cepellini d'autre part présentent le modèle selon lequel deux allèles du locus *ABO* permettent la synthèse des

glycosyltransférases A ou B. En 1990, Yamamoto isole l'ADNc codant pour la forme soluble de la glycosyltransférase A (Yamamoto et al., 1990). L'isolement ultérieur de l'ADNc codant pour la glycosyltransférase B permet de poser les bases moléculaires du polymorphisme ABO. Ces deux ADNc diffèrent par seulement sept nucléotides entraînant le changement de quatre acides aminés (positions 176, 235, 266, 268).

De nombreux autres polymorphismes du locus *ABO* ont été identifiés. Il s'agit du locus connu le plus polymorphe du génome humain après certains gènes du système HLA. Certaines mutations de moindre incidence affectent le phénotype. On distingue actuellement onze phénotypes A, six phénotypes B, et quatre phénotypes Cis (AB). Parmi les individus de groupe A, deux allèles principaux sont identifiés. Les allèles A1 et A2 (respectivement 80% et 20% des individus de groupe A). L'allèle A2 présente une délétion d'un nucléotide près de son extrémité N-terminale, et possède donc 21 acides aminés supplémentaires par rapport à l'allèle A1. Son activité enzymatique est plus faible. Plusieurs mutations responsables du phénotype O ont été identifiées. Les allèles O1 et O1 var (respectivement 54% et 40% des individus O) présentent une délétion dans la partie N terminale de l'ADNc entraînant un changement du cadre de lecture et donc la synthèse d'une protéine tronquée, non fonctionnelle. L'allèle O₂ (4% des individus O) résulte d'une mutation ponctuelle (G268R) inactivant l'enzyme (Figure 6). La présence d'une arginine volumineuse en position 268 obstrue le site de reconnaissance du donneur glycosylnucléotide.

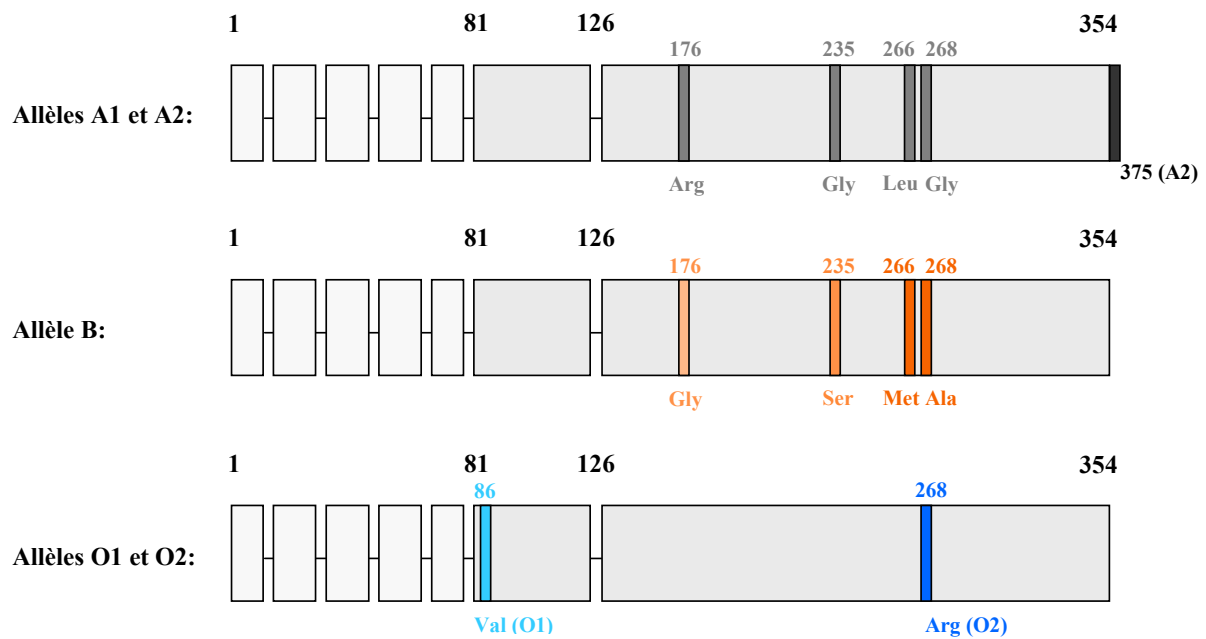


Figure 6 : Mutations les plus communes du locus ABO. La numérotation correspond à la position des codons.

L'ensemble des phénotypes ABH et des allèles du gène *ABO* est répertorié dans la base de données BGAGM (Blood Group Antigene Gene Mutation ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mhc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmut/home>).

Le gène *ABO* est localisé sur le chromosome 9q34 chez l'Homme. Il recouvre dix huit kilobases et se compose de sept exons codants. Le domaine catalytique est majoritairement codé par les exons 6 et 7. Une étude par mutagenèse du gène *ABO* permet de déterminer l'incidence de chacune des quatre mutations sur l'activité enzymatique de la glycosyltransférase. Si les acides aminés 176 et 235 ne semblent pas avoir d'influence majeure sur l'activité de l'enzyme, les acides aminés en position 266 et 268 sont critiques pour la balance A/B (Yamamoto, 2000). Une analyse plus précise du rôle des différents acides aminés dans l'activité catalytique de ces enzymes sera détaillée ultérieurement.

Les glycosyltransférases A et B transfèrent respectivement un groupement GalNac ou Gal sur les antigènes H (Figure 7).

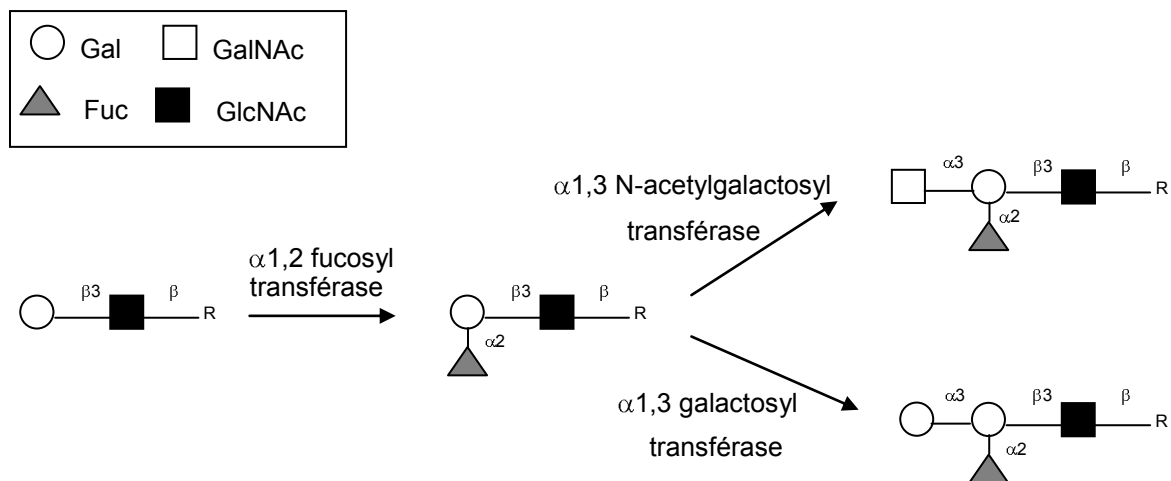


Figure 7 : Synthèse des antigènes H, A et B. La synthèse à partir du précurseur de type I est représentée. Elle est la même pour tous les autres types de précurseurs.

La synthèse du trisaccharide H est réalisée par une $\alpha 1,2$ -fucosyltransférase codée chez l'Homme par les gènes *FUT1* ou *FUT2*, qui transfère un fucose sur un précurseur disaccharidique. Six précurseurs ont été identifiés (Tableau 4).

Classe des précurseurs	Structure
Type 1	Galβ1,3GlcNAcβ1-R
Type 2 (N-acétyllactosamine)	Galβ1,4GlcNAcβ1-R
Type 3	Galβ1,3GalNAcα1-R
Type 4	Galβ1,3GalNAcβ1-R
Type 5	Galβ1,3Galβ1-R
Type 6 (lactose)	Galβ1,4Glcβ1-R

Tableau 4 : Structure des six chaînes précurseurs. R : radical glycoprotéique ou glycolipidique. Les précurseurs type 4 et 6 sont uniquement portés par des glycolipides, le précurseur type 5 n'a jamais été identifié chez l'Homme.

- Le polymorphisme ABO

L'expression des antigènes de groupe sanguin varie selon les individus et selon les populations. Dans la population française 43% des individus sont de groupe O, 45% de

groupe A, 9% de groupe B et 3% de groupe AB. Pourquoi un tel polymorphisme ABO alors qu'aucun rôle direct de ces antigènes n'est connu ? Seymour et ses collaborateurs proposent un modèle expliquant l'évolution du polymorphisme ABO (Seymour et al., 2004). La pression évolutive sur les antigènes ABO serait imposée par deux mécanismes complémentaires. Certains pathogènes, principalement des bactéries, tendent à uniformiser les pourcentages d'expression des antigènes. En effet, ils utilisent l'antigène A, B ou H le plus commun pour infecter le plus d'individus possible, ce qui entraîne une augmentation du phénotype rare. Les virus enveloppés privilégient quant à eux le phénotype O. Après infection de la cellule hôte, ils produisent des particules virales qui portent les antigènes de groupe sanguin sur leur enveloppe (Preece et al., 2002). La présence des antigènes A ou B entraîne une protection par les anticorps naturels. Leur absence augmente le spectre d'infection.

Le polymorphisme ABO est donc le fruit de ces deux interactions. Il y a un maintien du polymorphisme, principalement dû aux bactéries, mais une plus forte représentation du phénotype O due au virus. L'étude des pourcentages d'individus A, B, AB et O dans les populations permet de mettre en évidence une forte pression évolutive virale ou bactérienne. Ainsi, les populations des îles, se composant majoritairement d'individus de groupe sanguin O (54 à 100%), semblent avoir subi une forte sélection virale. Ce modèle ne permet pas d'expliquer pourquoi les individus de groupe B sont toujours moins nombreux que les individus A, et ne prend pas en compte la co-évolution pathogène / hôte. Une étude des populations est nécessaire pour valider ce modèle.

- Expression des antigènes de groupe sanguin ABH chez l'Homme

L'expression des antigènes de groupe sanguin chez l'Homme varie en fonction du phénotype de l'individu. En effet, les nombreuses mutations du locus *ABO* permettent d'expliquer l'existence de sous groupes A, B et O. Les individus de groupe A1 ont une densité antigénique sur les globules rouges de 10^6 / globule, contre 2 à $4 \cdot 10^5$ pour les individus A2, du fait de la différence d'efficacité de l'enzyme A2. Les structures A diffèrent également selon le phénotype. Les individus de groupe A1 synthétisent des antigènes A types 1, 2, 3 et 4 alors que les individus de type A2 présentent des antigènes A types 1 et 2. De plus, le A répétitif ou A type 3 (Clausen and Hakomori, 1989) présent sur les lipides est prédominant et caractéristique des individus A1. A partir d'une structure A type 2, l'ajout d'un fucose permet la formation de l'antigène H type 3, puis celle de A type 3 (Figure 8).

L'antigène Globo A (ou A type 4) n'est présent que chez les individus A1. Il constitue un composant mineur de la membrane des cellules érythrocytaires.

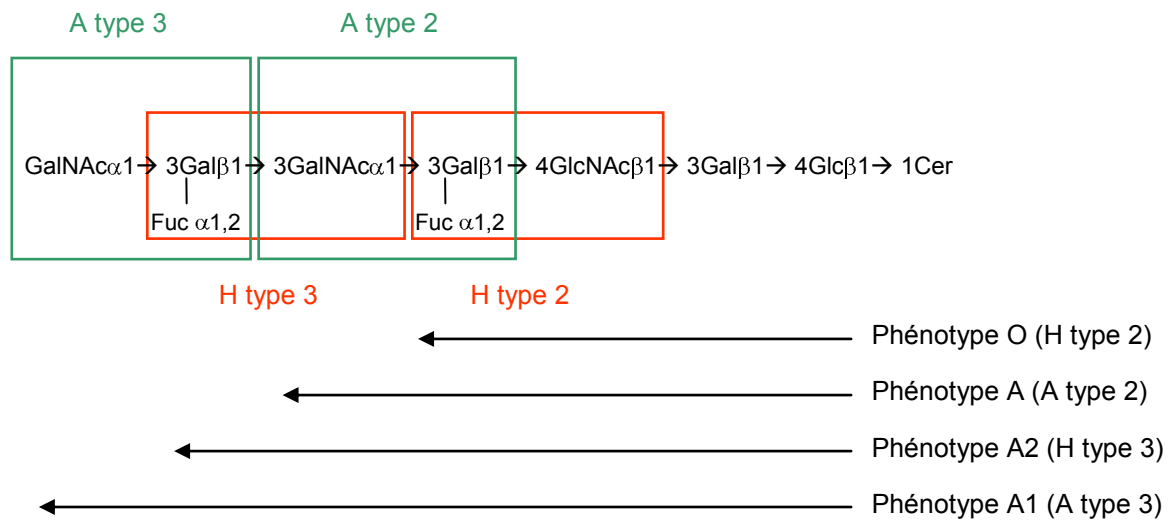


Figure 8 : Structure des antigènes H type 2, A type 2, H type 3, A type 3.

Les individus de groupe A faible et B faible présentent une densité antigénique inférieure à celle des groupes A2 et B. Il s'agit des groupes A3, Ax, Aend, Am Ael, B3, Bx, Bm, Bel, Bmos (Yamamoto, 2000). Les individus CisAB et B (A) possèdent des antigènes A et B, transmis simultanément, contrairement aux phénotypes AB classique. Ce phénotype correspond à des allèles codant pour des enzymes possédant la double activité enzymatique Gal / GalNAc transférase.

En plus des globules rouges, les antigènes de groupe sanguins ABH sont exprimés dans la plupart des cellules épithéliales et endothéliales. En revanche, ils ne sont pas présents sur les cellules musculaires, dans le tissu conjonctif, dans le cerveau, et dans le parenchyme hépatique. Leur expression varie au cours du développement. Vers cinq semaines de gestation, la plupart des tissus expriment les antigènes ABH dans les compartiments épithéliaux et endothéliaux et ce de façon équivalente, quelque soit le statut sécréteur. A partir de neuf semaines, l'expression épithéliale diminue alors que l'expression endothéliale persiste (Szulman, 1964). Dans certains tissus, ce déclin coïncide avec l'apparition de fonction d'organes spécifiques comme la sécrétion de mucines dans le tractus digestif. Plus tard, les antigènes ABH seront retrouvés dans les sécrétions exocrines sous la dépendance des gènes *ABO* et *FUT1*. Selon Oriol et ses collaborateurs, le contrôle génétique de leur expression suivrait leur origine embryonnaire. Les tissus d'origine ecto et mésodermique expriment ces

antigènes indépendamment des gènes *FUT2* et *FUT3*, majoritairement sur des structures de type 2. Les tissus d'origine endodermique expriment des antigènes de type 1 et 2 sous le contrôle de ces gènes. La majorité des tissus suivent ce schéma général. Il peut cependant y avoir une double régulation de l'expression des antigènes ABH, soit parce que les tissus possèdent une double origine embryonnaire, soit parce qu'ils sont des exceptions à la règle. C'est par exemple le cas pour les glandes profondes de l'estomac et du duodénum, ainsi que pour les cellules des glandes sudoripares et mammaires. Pour rendre compte de ces exceptions, Ravn et Dabelsteen ont proposé que le type et le degré de différenciation des cellules déterminerait le mode d'expression des antigènes ABH (Ravn and Dabelsteen, 2000).

L'expression des antigènes ABH varie selon l'état des cellules. Mandel confirme ces observations en montrant l'apparition séquentielle du précurseur H lors de la maturation des cellules de la muqueuse buccale. Seule la structure précurseur est présente sur les cellules germinales, l'antigène H apparaît sur les cellules des couches intermédiaires et l'antigène A/B sur les cellules superficielles (Mandel et al., 1992).

- Expression des antigènes de groupe sanguin dans d'autres espèces

Les antigènes ABH ont été identifiés dans un premier temps chez l'Homme. Cependant, ils sont présents dans de nombreuses espèces avec une expression tissulaire variable (Tableau 5). Au cours de l'évolution, l'expression des antigènes de groupe sanguin s'est étendue à des tissus de plus en plus nombreux. Seuls les globules rouges des grands singes et de l'Homme portent des antigènes ABH, cette expression est donc un phénomène évolutif récent.

ABH	Epithélium digestif	Epiderme	Récepteurs nerveux	Endothélium vasculaire	Globules rouges
 Batraciens	+	-	-	-	-
 Batraciens	+	-	-	-	-
 Petits mammifères	+	+	+	-	-
 Marmousets	+	+	+	-	-
 Babouins	+	+	+	+	-
 Grands singes anthropoïdes	+	+	+	+	+

Tableau 5 : Présence des antigènes tissulaires de groupe sanguins chez différentes espèces de vertébrés (Oriol et al., 1992).

En 1992, Kominato utilise une l'ADNc humain codant pour l'enzyme A comme sonde afin d'étudier son expression dans plusieurs espèces. Il montre ainsi une forte expression chez la souris et d'autres mammifères. Par contre une faible expression est mise en évidence chez le poulet, et aucune chez les organismes plus éloignés tels que la bactérie, la mouche et la grenouille (Kominato et al., 1992).

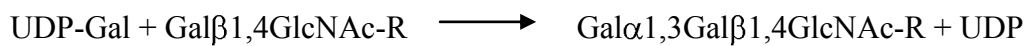
Chez la souris, un allèle particulier, *Cis(AB)*, est identifié (Yamamoto et al., 2001). Il code pour une glycosyltransférase qui possède les deux activités A et B. Cet allèle est largement représenté dans différentes espèces de souris. Au niveau de sa séquence primaire, il présente respectivement une glycine et une alanine aux positions 245 et 247 (équivalents des acides aminés 266 et 268 chez l'Homme). Chez l'Homme, on trouve une méthionine à la position 266 et une alanine à la position 268 sur l'allèle B. La glycine en position 245 est moins volumineuse et permettrait la fixation du GalNAc, pour la synthèse de l'antigène A.

L'ADNc codant pour la glycosyltransférase A de rat a été cloné par notre équipe en 2000 (Cailleau-Thomas et al., 2002). Cette étude chez le rat BDIX a montré une expression différentielle, selon les tissus, des antigènes A et B qui peut difficilement s'expliquer par une variation allélique du même locus *ABO* (voir plus loin).

Les études chez les primates montrent que l'expression des antigènes ABH dans les sécrétions est possible. Par contre, il semble que tous les phénotypes A, B et O ne soient pas présents chez tous les primates. Par exemple, les chimpanzés ne possèdent que le phénotype A ou O, alors que les gorilles ont uniquement le phénotype B ou O.

b/ L' α 1,3-galactosyltransférase

L' α 1,3-galactosyltransférase est responsable de la synthèse du Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R. Ce trisaccharide est présent dans toutes les espèces, exceptées l'Homme et les singes de l'ancien monde. Sa synthèse se fait selon la réaction suivante :

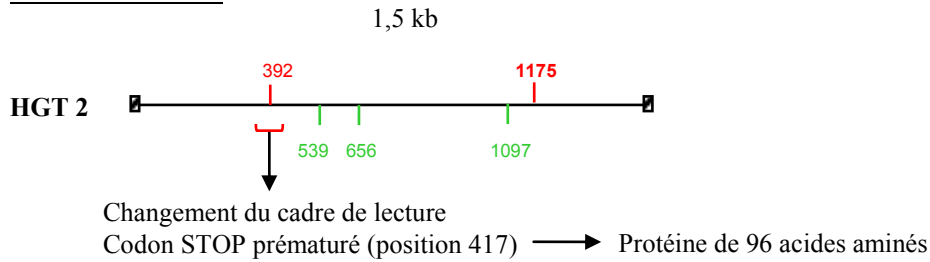


- Identification

L' α 1,3-galactosyltransférase a été purifiée en 1985, par WM. Blanken et DH. Van den Eijnden, à partir de thymus de veau (Blanken and Van den Eijnden, 1985). Elle transfère le galactose préférentiellement sur une glycoprotéine plutôt qu'un glycolipide. En 1989, l'équipe de NL. Shaper purifie l' α 1,3-galactosyltransférase pour produire des anticorps monoclonaux (Joziase et al., 1989). L'ADNc de l' α 1,3-galactosyltransférase bovine est isolé par criblage d'une banque de phages. L'étude de l'ADNc dans des cellules COS et MCF7, par Northern blot, ne montre pas d'expression de l'ARN dans ces cellules alors qu'un Southern blot permet sa détection.

Deux gènes homologues à l' α 1,3-galactosyltransférase bovine ont été identifiés chez l'Homme : un pseudogène sur le chromosome 12, et un gène non fonctionnel sur le chromosome 9 (Figure 9).

Chromosome 12



Chromosome 9

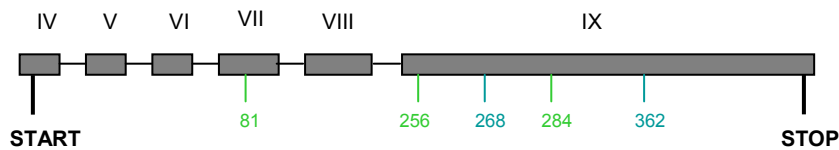


Figure 9 : Schématisation des gènes humains homologues de l' α 1,3-galactosyltransférase. **A :** pseudogène rétrotransposé situé sur le chromosome 12. Cette séquence correspond au clone HGT 2 identifié par Joziassse. Elle est flanquée de deux séquences ALU de 21 acides aminés (boîtes rayées). Les délétions sont indiquées en vert et les insertions en rouge. **B :** pseudogène situé sur le chromosome 9. La notation des exons se fait par homologie avec la notation des exons de marmouset. Les délétions (changement du cadre de lecture) sont indiquées en vert et les mutations entraînant l'insertion d'un codon STOP précoce en bleu. D'après (Joziassse et al., 1991; Koike et al., 2002).

Le pseudogène situé sur le chromosome 12 a été identifié par Joziassse et ses collaborateurs (Joziassse et al., 1991). Il recouvre 1,5 kilobases et est organisé comme un pseudogène issu de l'insertion d'un rétrovirus. De nombreuses mutations ont été identifiées dans ce clone. Au niveau du nucléotide 392, une insertion entraîne un changement de cadre de lecture et un codon STOP prématuré en position 417 ce qui entraîne la synthèse d'un peptide de 96 acides aminés, beaucoup plus court que l' α 1,3-galactosyltransférase bovine complète (368 acides aminés). De plus, d'autres insertion/délétions sont identifiées au niveau des nucléotides 539, 656, 1097 (délétions) et 1175 (insertion). Les séquences encadrant HGT2 possèdent des motifs répétés de 21 paires de bases, caractéristiques des pseudogènes. La datation de ce pseudogène permet de situer son apparition il y a 25-30 millions d'années, soit au moment de la divergence entre les singes du nouveau et de l'ancien monde.

Le gène localisé sur le chromosome 9 a été en partie identifié par Joziassse et ses collaborateurs (clone HGT10) (Joziassse et al., 1991). Une étude plus récente par l'équipe de M. Trucco montre que ce pseudogène situé sur le chromosome 9 présente une organisation exonique similaire au gène *Ggtal* de marmouset. Il présente plusieurs délétions entraînant un changement du cadre de lecture aux positions 81, 256 et 284 et deux codons STOP prématurés. Ce gène n'est pas fonctionnel chez l'Homme (Koike et al., 2002).

- Expression tissulaire chez l'Homme

De nombreuses études ont été menées pour identifier un groupement galactose en liaison α 1,3 sur des tissus humains avec la lectine *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* isoelectine B4 (GS1-B4), spécifique des groupements galactose terminaux en anomérie α . La lectine GS1-B4 reconnaît préférentiellement la liaison α 1,3, mais peut également reconnaître un galactose terminal en position α 1,4. Cependant, son absence de fixation sur des tissus ou des cellules exprimant le Gb3 suggère qu'elle peut être considérée comme spécifique des résidus α 3 Gal. Aucune fixation de GS1-B4 à la surface des cellules humaines n'a été observée. En parallèle, 1% des anticorps circulant chez l'Homme sont des IgM et IgG spécifiques du galactose en position α 3. Il semble donc que l'antigène α 3 Gal ne soit pas présent chez l'Homme.

- Expression dans d'autres espèces

L' α 1,3-galactosyltransférase a été identifiée dans un premier temps chez les bovins puis dans d'autres espèces : souris, cochon, chien (Eto et al., 1968; Spiro and Bhoyroo, 1984). L' α 1,3-galactosyltransférase a été identifiée chez le rat en 2003, par Taylor et ses collaborateurs. Le gène est organisé en 9 exons, dont 6 exons codants, et présente une large région 3', non traduite. L'ADNc, isolé à partir de la rate d'un rat (Sprague Dawley), code pour une protéine de type II de 337 acides aminés, présentant 90% d'homologie avec l' α 1,3-galactosyltransférase de souris. Une comparaison de cette enzyme avec l'iGb3 synthase de rat montre 42% d'homologie voire 51% dans le domaine catalytique. L'ARNm de ces deux enzymes est exprimé dans les mêmes types cellulaires : cœur, cerveau, rate, poumon, rein, avec néanmoins une plus forte expression de l' α 1,3-galactosyltransférase et de l'iGb3 synthase dans la rate ou dans les poumons, respectivement (Taylor et al., 2003).

L'étude de l'expression de l' α 1,3-galactosyltransférase dans différentes espèces a permis d'établir une corrélation entre l'activité enzymatique et la présence d'anticorps. En effet, de même que pour le système ABO, où les individus n'exprimant pas l'antigène A développent des anticorps anti-A, les espèces n'exprimant pas l' α 1,3-galactosyltransférase produisent des anticorps naturels, dirigés contre l'épitope α 3 Gal (Tableau 6).

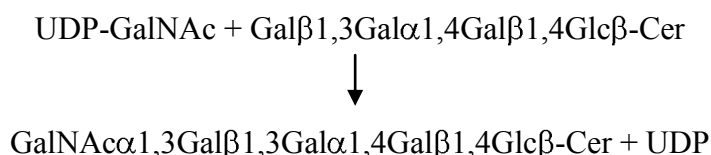
Espèces	Activité α 3GT	Antigène α 3 Gal	Anticorps anti- α 3 Gal
Vertébrés non mammifères	-	-	?
Marsupiaux	+	+	-
Mammifères non primates	+	+	-
Prosimiens	+	+	-
singes NM (Amériques)	+	+	-
singes AM(Afrique/Asie)	-	-	+
Humains	-	-	+

Tableau 6 : Expression de l' α 1,3-galactosyltransférase, de son antigène et des anticorps anti- α 3 Gal, dans différentes espèces. D'après (Galili, 2005). NM : Nouveau Monde, AM : Ancien Monde, α 3GT : α 1,3-galactosyltransférase.

D'après les études de l'équipe de Galili, une α 1,3-galactosyltransférase active serait apparue il y a 125 millions d'années, avant la divergence entre les mammifères placentaires et marsupiaux. Cependant, une pression de sélection différente lors de l'évolution aurait conduit à une inactivation de cette enzyme chez les singes de l'ancien monde et les Hommes, et à une conservation de sa fonctionnalité chez les autres mammifères. Les singes du nouveau et ancien monde ont été séparés géographiquement lors de la séparation des continents américain (« nouveau monde ») et africain (« ancien monde »). Une hypothèse avancée par Galili serait l'apparition d'un agent infectieux, il y a 25-30 millions d'années, exprimant l'épitope α 3 Gal dans la population africaine (singes de l'ancien monde). La perte de l'expression de l' α 3 Gal par une mutation du gène a entraîné une perte de tolérance à l'antigène et l'apparition d'anticorps dirigés contre cet épitope. Ces anticorps naturels auraient servi de moyen de défense contre le pathogène, permettant une résistance de la population à l'agent infectieux. Les singes du nouveau monde (sur le continent américain) n'ont pas subi cette pression de sélection, et n'ont donc pas perdu l' α 1,3-galactosyltransférase (Galili, 2005).

c/ La Forssman synthase

La Forssman synthase transfère un groupement N-acétylgalactosamine par une liaison $\alpha 1,3$ sur une glycoprotéine ou un glycolipide selon la réaction :



- Identification

Cette enzyme a été identifiée en 1996 chez le chien par Haslam et Baenziger. Après clonage, une comparaison de séquence montre son appartenance à la famille GT6. Trois membres de cette famille sont identifiés à cette époque. La Forssman synthase présente 42 % d'homologie avec la glycosyltransférase A et 35% d'homologie avec l' $\alpha 1,3$ -galactosyltransférase (Haslam and Baenziger, 1996).

En 1999, la même équipe identifie le gène codant pour la Forssman synthase humaine (Xu et al., 1999). Il est localisé sur le chromosome 9q34 et est organisé en 7 exons, comme les autres gènes de la famille GT6. L'analyse protéique de la Forssman synthase humaine montre une similarité de 86% avec la séquence canine, surtout au niveau du domaine catalytique, 42% avec la glycosyltransférase A, 38% avec l' $\alpha 1,3$ -galactosyltransférase de souris. L'étude des propriétés enzymatiques de la Forssman synthase humaine a été réalisée en comparaison avec l'enzyme canine. Aucune activité enzymatique n'a pu être mise en évidence. La construction de protéines chimériques homme - chien a montré qu'une mutation dans le domaine catalytique de l'enzyme humaine était responsable de son inactivation expliquant pourquoi l'antigène Forssman n'est pas exprimé chez l'Homme. Par contre, le précurseur glycolipidique ou glycoprotéique est présent dans de nombreux organes : placenta, ovaire, leucocyte périphériques, et dans une moindre mesure : thymus, foie et testicule. Cependant, il semblerait que l'antigène Forssman ait été identifié dans certains carcinomes pulmonaires (Ono et al., 1994; Taniguchi et al., 1981; Uemura et al., 1989). Aucune caractérisation biochimique n'ayant été réalisée, ces résultats sont à prendre avec précaution.

- Expression dans d'autres espèces

La Forssman synthase est exprimée dans d'autres espèces : mouton, cheval (Yamamoto et al., 1999), cochon d'inde, souris, poulet. Chez la souris, l'expression de l'antigène Forssman est tissu spécifique et son expression est régulée au cours du développement. L'expression de l'antigène Forssman a été suivie durant le développement embryonnaire de la souris. Les cellules du blastocyte expriment l'antigène de même que l'épiblaste et l'endoderme primaire qui en dérivent. Au cours du développement, l'épiblaste perd l'expression de Forssman lors de sa différenciation en ectoderme, alors que l'endoderme la conserve. Après 14 jours, l'expression de l'antigène Forssman est observée dans des cellules ne dérivant pas de tissus qui le présentaient antérieurement. Il semblerait que ce soit des cellules de Sertoli, car elles expriment l'antigène Forssman dans le testicule adulte (Stinnakre et al., 1981). Par ailleurs, les travaux de Krupnick et ses collaborateurs montrent une expression de l'antigène Forssman sur des cellules F9 (issues d'un carcinome embryonnaire de souris) ainsi que sur les tissus embryonnaires de souris normales (Krupnick et al., 1994).

Un étude de Sadahira et ses collaborateurs montre l'expression de l'antigène Forssman dans des sous populations de macrophages du stroma des foci hématopoïétiques chez la souris (Sadahira et al., 1991).

Par ailleurs, cet antigène est exprimé dans les tératocarcinomes non différenciés. Cette expression diminue lors de la différenciation alors qu'on assiste à une augmentation en parallèle de l'expression de l'antigène $\alpha 3$ Gal.

d/ L'isoglobotrihexosylcéramide synthase

L'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3) synthase transfère un groupement galactose sur le lactosylcéramide, en liaison $\alpha 1,3$, selon la réaction :



- Identification

L'iGb3 synthase a été identifiée chez le rat en 2000 par Keusch et ses collaborateurs. L'ADNc a été isolé à partir d'une banque de placenta de rat. Au niveau protéique, l'iGb3 synthase présente 39% d'homologie avec les autres membres identifiés de la famille, jusqu'à 51% si on considère uniquement le domaine catalytique. Au niveau enzymatique, l'iGb3 synthase peut transférer du galactose sur le globotrihexosylcéramide ou sur le lactosylcéramide. L'iGb3 synthase est largement exprimée dans les tissus de rat, mais surtout dans la rate, le thymus et les muscles squelettiques (Keusch et al., 2000b).

Aucune étude approfondie de l'iGb3 synthase humaine n'a été réalisée. Un homologue du gène de l'iGb3 synthase est présent chez l'Homme, sur le chromosome 9q34, mais on ne sait pas s'il code pour une enzyme fonctionnelle. Les études de Taylor et Milland suggèrent que l'ADNc codant pour l'iGb3 synthase humaine ne serait pas fonctionnel, suite à un problème dans la région promotrice et lors de l'épissage (Milland et al., 2006). Aucun détail concernant ces études n'est disponible. A l'heure actuelle, l'iGb3 n'a pas été caractérisé chez l'Homme, on ignore s'il est synthétisé dans cette espèce.

- Expression dans d'autres espèces

L'iGb3 a été identifié dans différentes espèces : rat, cochon, souris, chien, vache, cochon (Keusch et al., 2000b; Milland et al., 2005; Slomiany et al., 1974; Sung and Sweeley, 1979). A ce jour, le rôle de cet antigène n'est pas connu.

Cependant, des études récentes de l'équipe d'A. Bendelac montrent que les lymphocytes CD1d restreints à TCR invariant ($V\alpha 14J\alpha 18$ / $V\beta 8$ chez la souris, et $V\alpha 24J\alpha Q$ / $V\beta 11$ chez l'Homme) reconnaissent spécifiquement l'iGb3 (Zhou et al., 2004b). Le rôle de l'iGb3 dans ce contexte sera détaillé plus loin.

3- Structure des membres de la famille GT6

Les glycosyltransférases de la famille GT6 utilisent des donneurs et des accepteurs différents (donneur : UDP-Gal ou UDP-GalNAc, accepteur : Gb4, antigène H, lactosylcéramide, ...). Cependant, certaines caractéristiques structurales sont conservées entre

les différents membres. Cette famille appartient au clan III selon la classification CAZy. Toutes les enzymes conservent la conformation du glucide donneur lors du transfert et sont organisées en feuillet GTA. Elles possèdent donc un canal central formé d'au moins 8 feuillets β .

L'organisation structurale de trois membres de la famille GT6 a été détaillée : les glycosyltransférases A et B, et l' α 1,3-galactosyltransférase. Ces études structurales seront présentées, avec une généralisation de certaines caractéristiques aux autres membres de la famille GT6.

a/ Les glycosyltransférases A et B

En 1990, Yamamoto a posé les bases de l'implication des acides aminés de ces enzymes dans leur fonction. Il a ainsi défini le rôle critique des acides aminés en position 266 et 268 dans la liaison au donneur UDP-glucide (GalNAc ou Gal pour les glycosyltransférases A ou B, respectivement), et à l'accepteur (antigène H) (Yamamoto and Hakomori, 1990). La cristallographie de ces enzymes a permis de préciser ces données.

- Topologie générale

Le domaine catalytique des glycosyltransférases A et B est organisé en deux sous-domaines : un domaine N terminal (feuillet Rossman) qui reconnaît et lie le nucléotide donneur ; et un domaine C terminal, qui porte le site de liaison à l'accepteur. Ces deux domaines sont séparés par un sillon de 13 Å, où se trouve le site actif dans lequel se fait le transfert du glucide du donneur vers l'accepteur. Les quatre acides aminés critiques définis par Yamamoto et le motif DVD, commun à de nombreuses glycosyltransférases, sont localisés dans ce sillon. Une dernière caractéristique structurale de ces enzymes est la présence de deux boucles ne présentant pas de densité aux électrons, nommées boucles « désordonnées ». La première boucle se compose des acides aminés 176 à 194. Elle est proche du domaine N terminal et du premier acide aminé critique (176). La seconde boucle (acides aminés 345 à 354) est proche du domaine C terminal. Le rôle de ces boucles dans l'activité catalytique de l'enzyme n'est pas encore clairement défini. En effet, les études de Patenaude ne montrent pas de changement de conformation des boucles quand les enzymes

sont complexées avec le donneur et l'accepteur par rapport à l'état natif (Patenaude et al., 2002). Au contraire, en 2005, Yazer et Palcic mettent en évidence une organisation des boucles désordonnées lors du transfert du glucide du donneur vers l'accepteur. Ceci permettrait l'expulsion d'une molécule d'eau du site actif afin de faciliter la réaction. Ensuite, les boucles reprennent leur conformation initiale. Une mutation dans les boucles désordonnées entraîne un phénotype B faible dû à une diminution importante de l'activité B et une affinité plus faible pour le donneur et l'accepteur (Yazer and Palcic, 2005). L'implication des boucles désordonnées dans le transfert du glucide reste donc à préciser.

- Transfert du glucide donneur vers l'accepteur

L'implication des quatre acides aminés critiques définis par Yamamoto dans la réaction enzymatique a été largement étudiée (respectivement Arg/Gly 176, Gly/Ser 235, Leu/Met 266 et Gly/Ala 268 dans les glycosyltransférases A et B). L'acide aminé Arg/Gly 176 est situé le plus loin du site de liaison du substrat dans la première boucle désordonnée. Bien que sujet à controverse, le rôle de cette boucle dans la catalyse du transfert du glucide donneur vers l'accepteur expliquerait l'importance de cet acide aminé. Le second acide aminé (Gly/Ser 235) n'est pas non plus au contact direct du donneur. Cependant, la présence d'une glycine ou d'une sérine à cette position ne permet pas de fixer la même conformation de la chaîne aliphatique de l'antigène H accepteur. Il est donc possible que cet acide aminé ait un rôle dans la sélection de l'accepteur H.

L'interaction avec le donneur glycosylnucléotide impliquerait donc deux des quatre acides aminés : Leu/Met 266 et Gly/Ala 268. L'acide aminé en position 266 intervient dans une reconnaissance directe du donneur. Il est le seul des quatre acides aminés à être en contact direct avec le groupement OH/N-acétyl du Gal/GalNAc, et serait important pour la discrimination entre les deux glycosylnucléotides donneurs (Patenaude et al., 2002; Yazer and Palcic, 2005). La substitution L268M sur la glycosyltransférase A permet l'obtention d'une enzyme avec une forte activité A et B. Cependant, cet acide aminé est au contact du même résidu quelque soit le donneur. Des études complémentaires ont montré que la taille et la charge des acides aminés en position 266 et 268 sont déterminantes selon le glucide transféré. En effet, l'encombrement stérique dû à la méthionine 266 et à l'alanine 268 dans la glycosyltransférase B entraîne une élévation du plancher du sillon contenant le site actif, et donc un rejet de la N-acétylgalactosamine, trop volumineuse. Par contre, le sillon des glycosyltransférases A, avec un plancher moins élevé, accepte la N-acétylgalactosamine et le

galactose. La sélection positive de la N-acétylgalactosamine serait permise par la formation d'un pont hydrogène entre le groupement N-acétyl et l'histidine en position 233 de la glycosyltransférase A (Patenaude et al., 2002; Yazer and Palcic, 2005).

Patenaude et ses collaborateurs proposent un mode d'action de l'enzyme lors de la réaction catalytique. L'interaction de l'enzyme avec le donneur serait la première étape clé pour la liaison de l'accepteur. Ensuite, le transfert du Gal/GalNAc de l'UDP vers l'antigène H se ferait en 2 étapes. Dans un premier temps, le Gal/GalNAc serait transféré vers un acide aminé nucléophile, situé dans le site catalytique de l'enzyme, pour ensuite être déplacé vers l'accepteur. L'acide aminé nucléophile candidat est le glutamate en position 303. Le chargement du glucide sur cet acide aminé permet de placer le glucide donneur près des acides aminés 266 et 268 pendant la première et la deuxième étape de transfert (Patenaude et al., 2002). Ceci augmente donc la sélectivité envers le glucide donneur. Ce modèle de « double inversion » a cependant été remis en cause.

b/ L' α 1,3-galactosyltransférase

L' α 1,3-galactosyltransférase est responsable de la synthèse du xénoantigène et a donc fait l'objet de plusieurs études structurales. Notamment deux analyses cristallographiques, d'une précision de 2,3 Å (Gastinel et al., 2001) et de 1,3 Å (Boix et al., 2001) ont été publiées la même année, et permettent de définir les caractéristiques de cette enzyme.

L' α 1,3-galactosyltransférase a une structure globulaire formée de dix feuillets β , six hélices alpha, et six hélices 3_{10} . Le feuillet β 8 forme le plancher de la poche catalytique. Huit résidus de ce feuillet sont conservés dans la famille GT6 et seraient impliqués dans la liaison à l'UDP. Comme pour les glycosyltransférases A et B, le transfert du glucide du donneur vers l'accepteur par l' α 1,3-galactosyltransférase se ferait en deux étapes, par l'intermédiaire du glutamate 317 (position dans l' α 1,3-galactosyltransférase bovine). Cet acide aminé se trouve également dans le feuillet β 8 et est strictement conservé dans l'ensemble de la famille GT6. Cependant, l'implication du glutamate 317 dans ce mécanisme est remise en cause car sa mutation n'empêche pas l'action de l' α 1,3-galactosyltransférase.

Lors du transfert du galactose vers le lactose, le glucide donneur se niche dans la poche catalytique, où se trouvent les résidus His 280 et Ala 282, équivalents des acides aminés critiques 266 et 268 des glycosyltransférases A et B. L'histidine n'interagit pas directement avec le galactose. Cependant, il est possible qu'un changement de cet acide aminé entraîne une modification de la forme ou la taille de la poche catalytique et donc altère l'activité enzymatique. L'alanine permet l'entrée du galactose dans la poche catalytique et empêche celle de la N-acétylgalactosamine. Dans la poche catalytique se trouve également le motif DVD, commun à de nombreuses glycosyltransférases.

L' α 1,3-galactosyltransférase a été cristallisée sous forme monomérique et dimérique. La structure observée est la même mais, dans la forme dimérisée, les dix derniers acides aminés recouvrent le site catalytique et gênent ainsi son accessibilité. Il semble donc que la partie N terminale de cette enzyme soit impliquée dans son activité.

c/ Motifs protéiques conservés dans la famille GT6

En parallèle des études par cristallographie, une analyse de la séquence en acides aminés des membres de la famille GT6 par Heissigerová et ses collaborateurs en 2003 a permis la mise en évidence des motifs impliqués dans la fonctionnalité de l'enzyme (Heissigerová et al., 2003). Les domaines catalytiques des membres de la famille GT6 de différentes espèces alignés dans cette étude présentent 44% à 55% d'homologie (Figure 10). L'étude de Heissigerová porte sur un petit nombre d'espèces. Un représentant de chaque membre de la famille est étudié et permet la caractérisation de motifs impliqués dans l'interaction de l'enzyme avec le donneur ou avec l'accepteur. L'extension de cette étude à d'autres séquences de la famille GT6 sera détaillée par la suite.

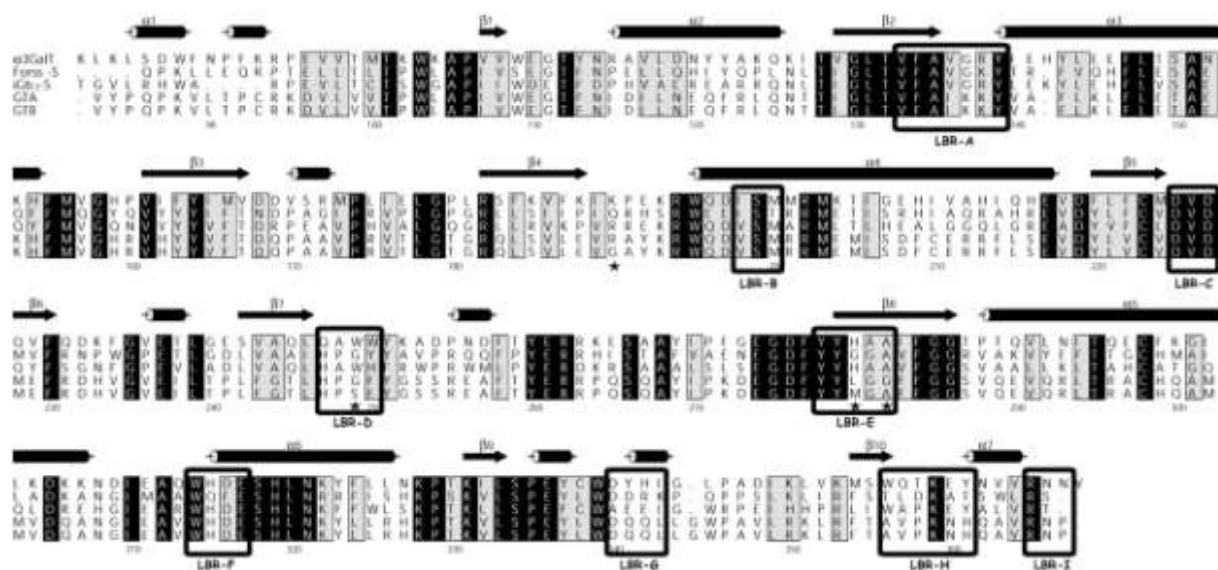


Figure 10 : Alignement de séquences de la famille GT6 de différentes espèces (α 1,3-galactosyltransférase bovine, Forssman synthase canine, glycosyltransférases A et B -GTA et B- humaines, iGb3 synthase de rat). Les éléments de structure secondaire de l' α 1,3-galactosyltransférase sont indiqués au dessus de la séquence. Les acides aminés conservés sont sur surlignés en noirs, les acides aminés similaires en gris. Les régions impliquées dans la liaison au ligand sont encadrées. Les étoiles indiquent les quatre acides aminés différents entre les glycosyltransférases A et B. D'après (Heissigerova et al., 2003).

Neuf régions de liaison au ligand (LBR : Ligand Binding Region), notées de A à I, ont été définies. Elles se lient soit à l'UDP, soit à l'accepteur. Deux LBR sont particulièrement conservées : LBR-A et LBR-C (motif DVD).

Dans un premier temps, décrivons les LBR impliquées dans la liaison au nucléotide UDP. Le motif DVD (LBR-C) permet la liaison au Mn^{2+} , cofacteur de l' α 1,3-galactosyltransférase et des autres enzymes de la famille GT6. C'est surtout la seconde asparagine qui est impliquée dans cette interaction. Le Mn^{2+} permet la stabilisation de l'interaction du motif DVD avec le donneur par son interaction avec les groupements phosphates de l'UDP. LBR-A interagit avec l'uridine et le ribose, de même que LBR-B et C pour ce dernier. LBR-H et I sont en contact avec les groupements phosphate de l'UDP. Dans ces deux régions, deux acides aminés sont conservés dans presque tous les membres de la famille : la lysine 359 pour LBR-H et l'arginine 365 pour LBR-I (numérotation de l' α 1,3-

galactosyltransférase bovine). En ce qui concerne la reconnaissance du glucide, quatre LBR sont impliqués. LBR-B, C et F permettent la mise en place de ponts hydrogènes entre le glucide et la protéine (quatre sont conservés dans presque toute la famille, mais il peut y en avoir jusqu'à sept, selon l'enzyme). Les acides aminés concernés sont la première asparagine du motif DVD, l'acide aminé acide de LBR-F, et la serine de LBR-B. La spécificité Gal/GalNAc est assurée par le LBR-E. Ce motif contient les deux acides aminés critiques en position 266 et 268 des glycosyltransférases A et B humaines. Enfin les motifs LBR-H et I permettent un changement conformationnel bloquant le glycosynucléotide dans le site de liaison.

La liaison à l'accepteur met en jeu quatre LBR. Le tryptophane de la région LBR-F ne varie quasiment jamais. Il est en contact avec le galactose accepteur. Le LBR-H jouerait un rôle dans la reconnaissance d'une substitution éventuelle au niveau du carbone C2 du résidu galactose. Le tryptophane présente dans l' α 1,3-galactosyltransférase et l'iGb3 synthase ne tolère pas de substitution, alors que l'alanine ou la thréonine, situées respectivement dans les glycosyltransférases A/B ou dans la Forssman synthase, accepte le fucose ou le N-acétyl en position C2. Le LBR-G interagirait lui aussi avec le fucose ou le N-acétyl du carbone C2 de l'accepteur de ces enzymes. Le LBR-D reconnaît la partie réductrice de l'accepteur.

L'ensemble des domaines LBR interagissant avec le donneur, l'accepteur et le Mn^{2+} est représenté sur la figure 11.

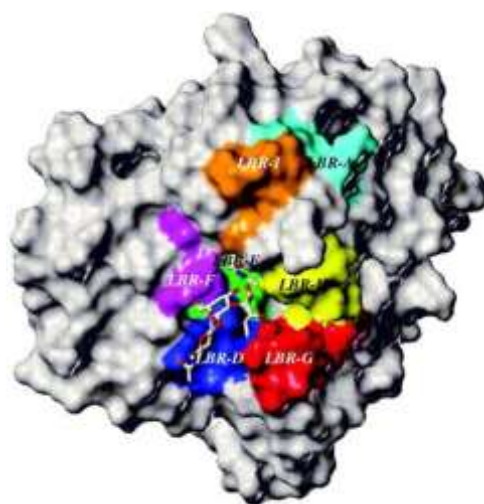


Figure 11 : Représentation graphique d'une modélisation de la glycosyltransférase A, en interaction avec Mn^{2+} , le glycosynucléotide donneur et l'accepteur. Les domaines de liaison au ligand (LBR) sont représentés en couleur. D'après (Heissigerova et al., 2003).

L'étude de l'ensemble de ces motifs sur une nouvelle séquence de la famille pourrait permettre de prédire quel serait son donneur potentiel, voire si une substitution de l'accepteur en C2 est possible ou non. Cependant, le contrôle par l'expérimentation doit toujours confirmer ces hypothèses.

d/ Caractéristiques des membres de la famille GT6

A la vue des études menées sur les enzymes de la famille GT6, des caractéristiques communes à tous les membres de la famille peuvent être mises en avant (Breton et al., 1998).

Le premier critère commun, non seulement aux membres de la famille GT6 mais à presque toutes les glycosyltransférases, est la présence du motif DXD (DVD dans les enzymes GT6). Il faut noter que la première asparagine est mieux conservée dans les enzymes qui conservent la conformation du glucide donneur par rapport à celles qui l'inversent dans lesquelles seule la deuxième asparagine intervient.

Le site de liaison à l'UDP se situe entre deux feuillets β centraux, et deux hélices alpha. Il est recouvert par l'extrémité C terminale. Le site de liaison à l'accepteur se trouve à proximité, dans une crevasse. Ces deux sites de liaison sont formés par les neuf LBR identifiés par Heissigerová et ses collaborateurs.

Les études par cristallographie des galactosyltransférases ont été conduites sur les formes globulaires des enzymes et ne prennent pas en compte l'implication de la tige et du domaine transmembranaire dans la fonction enzymatique. Cependant, l'étude d'une forme tronquée de l' α 1,3-galactosyltransférase montre que l'absence de la partie N-terminale n'affecte pas l'activité catalytique (Henion et al., 1994).

H- Fonctions physiologiques des antigènes synthétisés par les enzymes de la famille GT6

Les antigènes de groupe sanguin sont exprimés à la surface des cellules. Ils ont donc la possibilité d'intervenir dans des phénomènes de reconnaissance cellule-cellule ou cellule-matrice ainsi que dans les interactions avec des pathogènes.

Une variation de l'expression des antigènes ABH est observée sur des cellules en apoptose. Une étude de Rapoport et Le Pendu montre que l'expression des antigènes ABH sur les corps apoptotiques issus de cellules d'adénocarcinome colique diminue, quel que soit le mode d'induction utilisé (TNF- α , UV, anti-Fas) (Rapoport and Pendu, 1999). Un phénomène impliquant une apoptose massive des cellules est l'involution des glandes mammaires après l'allaitement. Chez le rat, les cellules épithéliales mammaires non apoptotiques présentent une forte expression de l'antigène B. Cet antigène participerait donc à la régulation de ce phénomène en ralentissant l'entrée en apoptose des cellules épithéliales (Mengwasser and Sleeman, 2001).

Le tractus digestif est tapissé de mucines, sur lesquelles se trouvent les antigènes de groupe sanguin tissulaires. S'ils peuvent jouer le rôle de barrière protectrice contre des bactéries ou des virus pathogènes, ils constituent une source énergétique pour la flore gastro-intestinale normale vivant en symbiose avec son hôte. Les bactéries qui composent cette flore possèdent des activités alpha-galactosidase, fucosidase, sialidase ou N-acétylgalactosaminidase permettant le clivage des antigènes de groupe sanguin tissulaires présents sur les mucines. Ainsi, une bactérie se nourrissant d' α -galactose utilisera son activité alpha-galactosidase pour dégrader les antigènes B. Elle sera présente en plus grande quantité chez des individus de phénotype B (Hoskins and Boulding, 1976a; Hoskins and Boulding, 1976b). L'équipe de Gordon a contaminé des souris élevées sur un milieu riche en polysaccharides avec des bactéries du tractus digestif humain. Les bactéries utilisent les polysaccharides comme source énergétique, et inversement, permettent la formation de mucine si les souris sont élevées sur milieu sans glucides complexes, établissant ainsi un équilibre (Sonnenburg et al., 2005).

Les antigènes H type 1 et A sont présents sur le récepteur à l'EGF. Ils auraient un rôle décisif tant dans la liaison de l'EGF que dans la cascade de transduction qui en découle (Defize et al., 1988).

I- Antigènes synthétisés par les enzymes de la famille GT6 et pathologies

1- Infections par des microorganismes

a/ Infections bactériennes

Helicobacter pylori est une bactérie responsable d'ulcères gastriques et duodénaux, d'atrophie des glandes gastriques et même de cancers gastriques, qui infecte de façon chronique plus de 50% de la population mondiale. Un grand nombre d'isolats de cette bactérie possèdent l'adhésine BabA qui permet l'attachement aux structures Le^b (Boren et al., 1993). Plusieurs études contradictoires quand à l'association entre les groupes sanguins et le profil d'infection par *H. pylori* ont été publiées. Certaines ne montrent aucune corrélation entre l'infection et les groupes sanguins (Gerhard et al., 1999; Oberhuber et al., 1997). Plus récemment, il a été montré que l'adhésine BabA de certaines souches, dites généralistes, se fixe sur Le^b, ALe^b et BLe^b. Au contraire, pour d'autres souches, dites spécialistes, BabA ne reconnaît que la structure Le^b ou ALe^b (Aspholm-Hurtig et al., 2004). L'utilisation de ces différentes adhésines pourrait expliquer les résultats contradictoires mentionnés ci-dessus. La bactérie *H. pylori* synthétise des antigènes de groupe sanguin sur ses lipopolysaccharides (LPS) : Le^x, Le^y, Le^a, Le^b, A. L'expression de ces antigènes est sujette à des variations réversibles et fréquentes (Wang et al., 2000). Ces changements phénotypiques et la diversité des antigènes présents sur le LPS pourraient jouer un rôle dans la pathogénicité de la bactérie. Trois fonctions biologiques de ces antigènes ont été proposées :

- Le mimétisme moléculaire dû à l'expression des antigènes de groupe sanguin à la surface des bactéries permettrait un échappement au système immunitaire, et ainsi une persistance de l'infection. Ainsi, les études de Zheng et de Wirth rapporte des corrélations entre le phénotype de la souche infectante et celui de l'hôte (Wirth et al., 1997; Zheng et al., 2000). Cette hypothèse n'a cependant pas toujours été vérifiée (Heneghan et al., 2000; Taylor et al., 1998).
- Un autre rôle, restant à démontrer, est la genèse d'anticorps anti-Le^{x/y} par l'hôte au contact du pathogène. Les anticorps se fixeraient sur les cellules épithéliales et engendreraient des lésions via la fixation du complément (Appelmek et al., 1997).

- La troisième fonction proposée pour les antigènes de groupe sanguin, présents à la surface des LPS bactériens, serait leur intervention dans l'adhérence et la colonisation de l'hôte par *H. Pylori*. Plusieurs études présentent l'implication des antigènes Le^{x/y} dans l'adhérence bactérienne (Heneghan et al., 2000; Osaki et al., 1998). Cela permettrait la fixation sur les cellules hôtes des bactéries dépourvues de BabA ou de celles colonisant des individus Lewis négatifs.

Certaines souches d'*Escherichia coli* ainsi que de *Shigella*, pathogènes pour l'Homme, produisent des Shiga toxines, ou vérotoxines, qui se fixent sur les glycolipides de la série globo, entraînant des diarrhées et des colites hémorragiques. Ces toxines se fixent sur le globoside Gb4. Une étude de Elliott et ses collaborateurs a montré que l'expression de la Forssman synthase fonctionnelle de chien ou de souris dans des cellules Vero (sensibles aux Shiga toxines) diminuait leur sensibilité en bloquant la fixation de la toxine. En parallèle, l'expression de l'enzyme humaine (non fonctionnelle) n'apporte pas de variation à la sensibilité (Elliott et al., 2003). L'inactivation de la Forssman synthase au cours de l'évolution pourrait donc avoir entraîné une augmentation de la sensibilité de l'Homme aux Shiga toxines.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste pouvant causer de sérieuses infections dans la plupart des tissus et des organes humains. Les deux lectines PA-I et PA-II, importantes dans l'adhérence de la bactérie, montrent une forte affinité pour les antigènes B et ABH, respectivement. De plus, des dérivés sialylés ou sulfatés de Le^x sont reconnus par des protéines flagellaires de certaines souches de *P. aeruginosa* (Scharfman et al., 2001; Scharfman et al., 2000). Par ailleurs, la souche 60 de cet organisme, responsable d'otites externes, possède une lectine spécifique de l'antigène A et infecte préférentiellement les individus A et AB (Steuer et al., 1995).

Le *Plasmodium falciparum* est responsable de 50% des cas de malaria (ou paludisme) et de 80% des cas mortels. Le cycle de vie de ce parasite est complexe. Après transmission par une piqûre de moustique anophèle femelle, il prolifère dans le foie, puis dans le sang. La lyse des érythrocytes infectés libère la forme mérozoïte du parasite, qui peut ensuite infecter d'autres globules rouges qui formeront des rosettes avec des globules rouges sains. Ceci augmente le degré de sévérité de la maladie en obstruant la microvascularisation du cerveau, du foie, des poumons et du placenta (Carlson et al., 1990; Rowe et al., 1995). Les antigènes

ABH seraient impliqués dans ce processus en jouant le rôle de corécepteurs (Barragan et al., 2000).

Il existe trois espèces de *Schistosoma* infectant l'Homme : *S. Haematobium*, touchant d'abord le système urinaire, *S. mansoni* et *S. japonicum* qui sont des parasites intestinaux. Une infection par ces parasites se caractérise par des maux de ventre, des diarrhées, des hépatomégalies et des splénomégalies. Une sensibilité particulière des enfants de phénotype B sécréteur à l'infection par *S. mansoni* a été observée (Trangle et al., 1979). Par ailleurs, l'étude de Ndamba et ses collaborateurs montre que les espèces *S. mansoni* et *S. Haematobium* infecteraient plus particulièrement les enfants de groupe A au Zimbabwe (Ndamba et al., 1997).

b/ Infections parasitaires

Gardiana est un parasite intestinal trouvé le plus souvent dans le duodénum et l'intestin grêle, où il interfère avec l'absorption des graisses, entraînant une carence en vitamines liposolubles. L'association entre les groupes ABO et ce parasite n'est pas clairement définie. En effet, si deux études ont montré une augmentation de la fréquence du groupe A parmi les enfants infectés par *Gardiana lamblia* (Barnes and Kay, 1977; Zisman, 1977), l'étude de Adungo et Ondijo ne permet pas d'associer ces deux paramètres (Adungo and Ondijo, 1987). L'étude de Sotto et ses collaborateurs trouve une corrélation entre le groupe A et les infections récurrentes à *Gardiana lamblia* (Sotto et al., 1983).

2- Infections virales

L'interaction potentielle du virus VIH avec les antigènes de groupe sanguin a été étudiée. Des tests d'inhibition ont montré que l'utilisation d'anticorps anti-A1 bloquait la fixation du virus sur les lymphocytes T (Hansen et al., 1990). De plus, ces anticorps permettent l'immunoprécipitation de la glycoprotéine virale gp120, impliquée dans l'adhérence du virus aux lymphocytes T. Les antigènes A1 pourraient donc jouer un rôle dans la dissémination virale (Glinsky, 1992). Cette hypothèse n'a pas été confirmée.

3- Maladies non infectieuses

a/ Maladies pulmonaires

La broncho-pneumopathie obstructive chronique (COPD) est caractérisée dans un premier temps par une destruction protéolytique du parenchyme pulmonaire avec une augmentation de la taille des espaces aériens. Ensuite, l'inflammation, l'hyper sécrétion de mucus et l'œdème provoquent un rétrécissement des aires périphériques, ce qui entraîne une augmentation de la résistance pulmonaire et une diminution du volume respiratoire. L'association entre la COPD et les antigènes de groupe sanguin a été initialement décrite par Cohen et ses collaborateurs, montrant une corrélation entre les individus de groupe sanguin A et le déclin de la fonction pulmonaire (Cohen et al., 1977).

L'étude de Kauffmann et ses collaborateurs de 1996 présente le même profil de susceptibilité des individus à l'asthme selon leur phénotype ABH que pour la COPD (Kauffmann et al., 1996).

b/ Maladies cardio-vasculaires

La sensibilité à l'infarctus du myocarde semble être corrélée avec le patron d'expression des antigènes de groupe sanguin. En effet, les individus de groupe sanguin A semblent plus sensibles à cette maladie. Ils présentent un taux de cholestérol et de LDL (sa lipoprotéine porteuse) plus élevé (George et al., 1987; Gillum, 1991; Whincup et al., 1990). En fait, chez les individus de groupe A, le taux de cholestérol est augmenté d'environ 4 mg/dl (Wong et al., 1992). Il se pourrait que l'antigène A altère la fixation des LDL sur leurs récepteurs cellulaires, ce qui entraînerait une augmentation de la quantité de LDL dans le sang. Une modulation de la fixation de l'EGF à son récepteur, dépendante des antigènes ABH, a été décrite précédemment (Defize et al., 1988), ce modèle pourrait s'appliquer dans ce cas.

Les antigènes ABH interviennent dans le phénomène de coagulation. Le facteur von Willebrand (vWf) est une glycoprotéine. Les antigènes ABH sont portés par des N-glycannes

de la boucle A1 de la protéine, qui intervient dans l'interaction de vWf avec la glycoprotéine Ib des plaquettes. De plus, le vWf porte le facteur VIII, ces deux protéines étant liées fonctionnellement. Le vWf est impliqué dans les thromboembolies, les maladies artérielles et coronariennes, tandis que le facteur VIII est associé au risque coronarien, à l'ischémie cérébrovasculaire et aux thromboses veineuses. Les individus de groupe sanguin A, B et AB présentent un niveau plasmatique de ces deux facteurs plus élevé que celui des individus O, ce qui est un facteur de risque pour ces maladies. La corrélation entre les groupes sanguins et le niveau plasmatique de vWf et du facteur VIII a été démontrée au niveau génotypique et phénotypique (Souto et al., 2000). La suppression des antigènes A ou B sur le vWf entraîne une sensibilisation de ce facteur à la dégradation protéolytique, et par conséquent une diminution de sa durée de vie dans la circulation, et une diminution de l'agrégation plaquettaire en présence du cofacteur ristocétine (Moeller et al., 2001; Sarode et al., 2000). Il semblerait que ce soit l'expression de l'antigène H qui médie l'effet ABO sur la concentration plasmatique de vWf (O'Donnell et al., 2002).

c/ Maladies du foie

La cholangite primaire sclérosante (PSC) est une maladie chronique du foie qui évolue fréquemment en cirrhose et cancer hépatique mortel. Elle est associée à des maladies inflammatoires de l'intestin dans 50% à 75% des cas. Dans l'étude de Bloom et ses collaborateurs, 95% des patients de phénotype O montrent une expression anormale de A ou B sur leur épithélium biliaire et leurs hépatocytes (Bloom et al., 1993). Cette expression anormale, fréquemment rencontrée dans certains cancers, peut être prise en compte dans le risque d'évolution de la maladie vers un cancer hépatique.

d/ Maladies auto-immunes

L'implication des anticorps dirigés contre l'épitope $\alpha 3$ Gal dans l'auto-immunité a été discutée. Il semblerait en effet que les bactéries de la flore intestinale, portant l' $\alpha 3$ Gal, soient une source antigénique constante pour ces anticorps. Si des bactéries adhèrent à des cellules, elles permettant un contact des anticorps avec ces mêmes cellules, entraînant ainsi un processus inflammatoire, qui dégénérerait ensuite en maladie auto-immune (Galili et al., 1988).

4- Xénogreffes

Devant les difficultés à obtenir des organes humains en vue d'une greffe, de nombreux chercheurs se sont intéressés aux organes de porc, très proches par leur structure des organes humains. Cependant, le problème de la présence des anticorps naturels anti- $\alpha 3$ Gal s'est rapidement posé. Un essai de greffe d'un organe de porc à un singe s'est soldé par le rejet du greffon en 30 minutes (Platt, 1994). Les anticorps IgM de l'hôte dirigés contre l'épitope $\alpha 3$ Gal reconnaissent l'endothélium vasculaire du greffon et activent la cascade du complément. Ceci entraîne une destruction de l'endothélium vasculaire et un rejet hyperaigu du greffon. Des études complémentaires ont également montré une implication des IgG. Différentes stratégies sont mises en place dans le but de discriminer la réponse immunitaire dirigée contre l'antigène $\alpha 3$ Gal chez le porc. Cependant, l'identification récente de l'iGb3 synthase qui semble non fonctionnelle chez l'Homme pose un nouveau problème quand à la présence de l'iGb3 sur les cellules porcines et la réponse immunitaire dirigée contre ce dernier. Cet aspect sera discuté plus loin.

5- Cancer

De nombreuses modifications de l'expression des antigènes ABH ont été observées dans les cellules tumorales. Le tableau 7 résume les différentes altérations de l'expression de ces antigènes dans différents tissus.

Tissus	Changement d'expression des Ag ABH	Références
Estomac	Perte des antigènes A et B	(Hirohashi et al., 1984)
	Expression incompatible d'Ag A	(David et al., 1993; Ernst et al., 1984)
Côlon proximal	Perte des antigènes A et B	(Schoentag et al., 1987)
	Expression incompatible d'Ag A et B	(Ernst et al., 1984)
Côlon distal	Apparition des antigènes A, B et H	(Blasco et al., 1989; Cordon-Cardo et al., 1986; Ernst et al., 1984; Schoentag et al., 1987)
	Expression incompatible d'Ag A et B	{Itzkowitz, 1992 #174; Itzkowitz, 1992 #175; Itzkowitz, 1990 #173 ;; Clausen, 1986 #138; Dabelsteen, 1988 #143 Kim, 1990
Pancréas	Perte des antigènes A, B et H	(Itzkowitz et al., 1987)
	Expression incompatible d'Ag A et B	(Pour et al., 1988)
Foie	Apparition focale des Ag A, B et H	(Okada et al., 1987)
	Expression incompatible d'Ag A et B	
Poumon	Perte des antigènes A, B	(Hirohashi et al., 1984; Lee et al., 1991; Matsumoto et al., 1993)
	Expression incompatible d'Ag A et B	(Kawai et al., 1993)
Vessie	Perte des antigènes A, B et H	(Coon et al., 1985; Orntoft et al., 1987; Orntoft et al., 1989)
Prostate	Perte des antigènes A, B	(Perlman and Epstein, 1990)
	Augmentation de H type 2	(Perlman and Epstein, 1990)
Sein	Perte des antigènes A, B	(Nakagoe et al., 1991; Nakagoe et al., 1998; Vowden et al., 1986)
	Augmentation de H	(Ura et al., 1992)
Endomètre	Perte des antigènes A, B	(Griffin and Wells, 1993; Skovlund, 1997)
	Augmentation de H type 2	(Memon et al., 1990)
Ovaire	Perte des antigènes A, B	(Metoki et al., 1989; Welshinger et al., 1996)
	Expression incompatible d'Ag A	(Metoki et al., 1989)
Tête et cou	Perte des antigènes A, B	(Dabelsteen et al., 1988a; Stenersen and Dabelsteen, 1992)
	Expression incompatible d'Ag A	(Yokota et al., 1994)
Thyroïde	Apparition des Ag A, B et H	(Gonzalez-Campora et al., 1998; Vierbuchen et al., 1992 ; Vowden et al., 1986)

Tableau 7 : Altérations de l'expression des antigènes tissulaires ABH dans différents types de cancers chez l'Homme.

Trois types d'altérations de l'expression des antigènes ABH ont été observées dans les carcinomes : la perte, l'expression oncofœtale, et l'expression incompatible.

a/ Perte d'expression des antigènes ABH

La perte d'expression des antigènes ABH est la modification d'expression des antigènes ABH la plus fréquemment rencontrée. Deux cas de figures sont à considérer :

- la perte des antigènes A et B peut être accompagnée d'une surexpression de l'antigène H, chez des patients de groupe sanguin A, B ou AB. Ce phénomène est dû à une altération des galactosyltransférases A ou B entraînant un démasquage de l'antigène H. Cette situation a été observée dans les cancers de l'utérus (Griffin and Wells, 1993), de la prostate (Perlman and Epstein, 1990) et du sein (Vowden et al., 1986).
- La perte des antigènes A et B peut s'accompagner d'une diminution, voire d'une disparition de l'antigène H. Cette situation est rencontrée dans les cancers du pancréas (Itzkowitz et al., 1987; Pour et al., 1988), de la vessie (Coon et al., 1985; Orntoft et al., 1989), de l'épithélium buccal (Dabelsteen et al., 1988a; Yokota et al., 1994) et de l'ovaire (Welshinger et al., 1996).

Il semblerait que la perte d'expression des antigènes AB soit due à une perte de l'activité enzymatique, et à l'absence du messenger correspondant (Mandel et al., 1992; Meldgaard et al., 1994; Orntoft et al., 1996). Deux mécanismes peuvent expliquer ce phénomène : une perte d'hétérozygotie du chromosome 9 (Orlow et al., 1998), ou un blocage de la transcription du gène *ABO*, dû à une hyper-méthylation (Iwamoto et al., 1999; Kominato et al., 1999). Dans le cancer de la vessie, la perte d'expression de l'antigène A a été constatée et semble due à une perte ou à une hyper méthylation du gène selon les cas (Chihara et al., 2005).

b/ Néoexpression des antigènes ABH

Dans les cancers colorectaux, une néoexpression des antigènes ABH est observée (Dabelsteen et al., 1988b; Itzkowitz, 1992). Chez les foetus, les antigènes H, A et B sont présents de façon homogène tout au long du colon, mais ils se maintiennent uniquement dans le colon proximal à partir de la naissance (Yuan et al., 1985). L'expression des antigènes ABH dans le colon distal lors de la cancérogenèse explique la qualification d'antigène oncofœtal (Itzkowitz, 1992). La réexpression de ces antigènes est un évènement précoce dans la carcinogenèse colorectale qui a lieu au stade des polypes précancéreux (Itzkowitz et al., 1986). La synthèse des antigènes ABH dans ces cellules cancéreuses est due à l'apparition

d'une activité α 1,2-fucosyltransférase (Yang et al., 1994), produit des gènes *FUT1* et *FUT2* (Nishihara et al., 1999). Il y a ainsi synthèse de l'antigène H puis des antigènes A et B. En effet, des glycosyltransférases A et B fonctionnelles sont présentes dans le colon sain mais l'absence de l'antigène H empêche la synthèse des antigènes A et B. L'activité fucosyltransférase permet la synthèse du substrat de ces deux enzymes et donc l'expression de H, A et/ou B selon le génotype de l'individu. L'expression oncofoetale des antigènes A, B et H apparaît également dans les cancers thyroïdiens (Gonzalez-Campora et al., 1998) et dans les hépatocarcinomes (Okada et al., 1987).

c/ Expression incompatible des antigènes ABH

L'expression incompatible d'antigènes de groupe sanguin concerne un nombre limité de patients, de 1% à 15% selon le type de cancer. Elle concerne des carcinomes du sein, de l'ovaire (Metoki et al., 1989), de l'estomac (David et al., 1993; Hattori et al., 1987), du côlon (Clausen et al., 1986; Yuan et al., 1985), du pancréas (Itzkowitz et al., 1987; Pour et al., 1988), du foie (Okada et al., 1987) et du poumon (Kawai et al., 1993). Bien que le tétrasaccharide A type 1 ait été parfaitement identifié (Clausen et al., 1986) et l'activité glycosyltransférase A mise en évidence dans des tumeurs gastriques (David et al., 1993), le mécanisme moléculaire permettant la synthèse d'antigène A chez des individus homozygotes pour l'allèle O n'est toujours pas connu.

III- Reconnaissance des glycolipides par une population particulière de lymphocytes : les NKTi

Dans la population lymphocytaire, on distingue les lymphocytes T conventionnels, dont l'activation dépend de l'interaction d'un TCR (T cell Receptor) $\alpha\beta$ avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II (CMH I / II) et le peptide, et les lymphocytes T non conventionnels, qui se distinguent soit par leur TCR (TCR $\gamma\delta$), soit par la molécule présentatrice d'antigène reconnue (CD1). Les NKT (Natural Killer T cells) à TCR invariant (NKTi) forment un sous-groupe de lymphocytes non conventionnels. Ils sont activés suite à la reconnaissance d'un glycolipide présenté au TCR par la molécule présentatrice d'antigène CD1d. La première molécule activatrice des NKTi identifiée est l' α galactosylcéramide purifiée à partir d'une éponge marine.

Lors de ma thèse, je me suis intéressée aux cellules NKTi humaines. La plupart des études sur les NKTi ont été conduites dans le modèle murin ; les données connues chez l'Homme et la souris seront présentées.

D- Présentation des NKTi

1- Reconnaissance d'un glycolipide dans le contexte du CD1d

a/ CD1d : molécule présentatrice d'antigènes glycolipidiques

- Structure génomique et protéique

Le gène *CD1D* humain est situé sur le chromosome 1q23.1. La souris possède deux gènes *Cd1d1* et *Cd1d2*, issus d'une duplication récente, localisés sur le chromosome 3 (Bradbury et al., 1988; Calabi et al., 1989). Le gène *CD1D* présente une organisation introns / exons similaire à celle des gènes des molécules présentatrices d'antigènes CMH I et code pour la protéine de type I CD1d constituée de trois domaines α 1, 2 et 3, d'une partie transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique. Après glycosylation, la protéine CD1d de 50 kDa est exprimée à la surface de la cellule sous forme hétérodimérique, associée de façon non covalente à la β 2 microglobuline (β 2m) (Roark et al., 1998). Il semblerait que l'association avec la β 2m soit nécessaire à la localisation membranaire de CD1d. Des molécules CD1d non couplées à la β 2m ont été identifiées à la surface membranaire mais leur fonction n'est pas connue (Balk et al., 1994). La molécule CD1d permet la présentation d'un ligand lipidique à la surface de la cellule (Koch et al., 2005).

- Distribution tissulaire

Une comparaison de la distribution tissulaire chez l'Homme et la souris est présentée dans le tableau 8.

	Homme	Souris
Thymocytes corticaux	+ ¹	+ ⁵
Lymphocytes T	+ /- (après stimulation PHA) ²	+ ⁵
Lymphocytes B	+ (LB circulant) ¹	+ ⁵
Monocytes, Macrophages	+ ^{1,3}	+ ^{5,6}
Cellules Dendritiques	+ ^{1,3}	+ ⁷
Foie	+ (hépatocytes) ⁴	+ (hépatocytes) ⁸
Pancréas	+ (cellules acineuses) ⁴	-
Rein	+ ⁴	-
Utérus	+ (épithélium) ⁴	-
Muscles lisses (vaisseaux sanguins)	+ ⁴	-
Peau	+ (kératinocytes, DC dermiques) ^{5, 10}	-
Intestin	+ (épithélium) ⁴	-

Tableau 8 : Expression tissulaire de CD1d chez l'Homme et la souris.

1 : (Exley et al., 2000)

6 : (Roark et al., 1998)

2: (Salamone et al., 2001)

7 : (Brossay et al., 1997)

3 : (Spada et al., 2000)

8 : (Mandal et al., 1998)

4 : (Canchis et al., 1993)

9 : (Bleicher et al., 1990)

5 : (Bonish et al., 2000)

10 : (Gerlini et al., 2001)

Si les lymphocytes B (LB) expriment de façon constitutive le CD1d chez l'Homme et la souris, seuls les lymphocytes T (LT) murins présentent le CD1d à leur surface en absence d'activation. Cependant, même chez la souris, l'expression de CD1d dans les LT périphériques est nettement plus faible que dans les LT CD4⁺ CD8⁺ (Roark et al., 1998). Par ailleurs, de nombreuses cellules épithéliales humaines expriment le CD1d, ce qui n'est pas le cas chez la souris.

- Chargement du glycolipide sur le CD1d et présentation à la surface

Les molécules CD1d nouvellement synthétisées sont dirigées vers le réticulum endoplasmique (RE) et repliées grâce à l'action de deux protéines chaperones (calnexine et calréticuline) et de la thiol oxydoréductase ERp57, ce qui permet la liaison à la β 2m (Kang

and Cresswell, 2002). Le sillon CD1d est alors bloqué par la chaîne invariante Ii (qui bloque le site de liaison à l'antigène de CMH II) ou par un phospholipide endogène non antigénique jusqu'à ce que la molécule CD1d soit au contact d'un glycolipide antigénique (Joyce et al., 1998; Park et al., 2004). Ensuite, on peut distinguer deux voies d'expression de CD1d à la surface cellulaire. Ou bien les molécules CD1d sont directement dirigées vers l'endosome après chargement avec la chaîne invariante Ii, sans transiter par la membrane plasmique ; ou bien elles sont rapidement exprimées à la surface après chargement d'un glycolipide non antigénique. Ensuite, les molécules CD1d de surface sont endocytées (la moitié des molécules CD1d sont internalisées en une heure) et subissent plusieurs cycles d'internalisation – réexpression entre l'endosome de recyclage et la membrane plasmique (Jayawardena-Wolf et al., 2001). L'internalisation et l'aiguillage vers l'endosome précoce sont sous le contrôle des protéines de la famille des adaptines (AP : Adaptor Protein) (Lawton et al., 2005).

Dans l'endosome, la libération du sillon CD1d et le chargement du glycolipide immunogène se font en même temps. Cette étape est catalysée par les LTP (Lipid Transfer Protein) qui captent le lipide de manière spécifique, le solubilisent et le transportent dans l'espace intra-cellulaire aqueux. La saposine est une protéine LTP indispensable à la sélection positive des NKTi, les souris invalidées saposine -/- n'ayant pas de NKTi (Zhou et al., 2004a). Enfin, les molécules CD1d chargées avec le lipide immunogène et associées à la $\beta 2m$ sont exprimées à la surface de la cellule.

Il semble que le ligand lipidique chargé sur les molécules CD1d soit apprêté par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de façon similaire aux ligands protéiques, par des enzymes endosomiales. Les lipides antigéniques mycobactériens sont internalisés soit par DC-SIGN (sur les DCm) soit par le récepteur mannose (sur les macrophages) (Lawton et al., 2005). Récemment, une voie exogène de présentation des antigènes bactériens a été décrite. La CPA sécrèterait un complexe lipide exogène / apoprotéine E qui serait capté puis internalisé par les DC, avant que le lipide exogène ne soit présenté à leur surface par le CD1d (van den Elzen et al., 2005). L'apprêtement du glycolipide endogène présenté par les cellules nécessite également l'action d'enzymes endosomiales. Par exemple, l'hexosaminidase clive l'iGb4 en iGb3 avant son chargement sur le CD1d (Zhou et al., 2004a).

b/ Les ligands des cellules NKTi

L'antigène chargé dans le sillon de la molécule CD1d est un lipide qui doit présenter certaines caractéristiques. Tant la queue lipidique que la tête polaire du lipide sont importantes pour l'activation de NKTi. Le sillon de CD1d se compose de deux poches impliquées dans des interactions hydrophobes, la queue lipidique doit donc se composer de deux chaînes acyles pour être chargée dans le CD1d (Zeng et al., 1997). Par ailleurs, la tête hydrophile est impliquée dans la reconnaissance par les NKTi (Fischer et al., 2004).

- L' α galactosylcéramide

L' α galactosylcéramide a été purifié à partir d'une éponge marine, *Agelas mauritanus*. Sa forme synthétique est le KRN7000 ((2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopyranosyl)-2-5N-hexacosanoylamino)-1,3,4-octadecanetriol) (Figure 12).

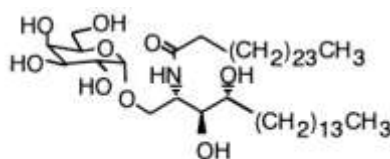


Figure 12 : Structure du KRN7000

Le KRN7000 a été utilisé dans un premier temps pour ses propriétés anti-tumorales. Son administration à des souris inoculées avec les cellules tumorales B16 ou EL4 prolonge leur survie (Kobayashi et al., 1995). Par la suite, la reconnaissance du KRN7000 dans le contexte du CD1d par les cellules NKTi a été mise en évidence et a permis l'étude de l'interaction des NKTi avec les cellules cibles (Burdin et al., 1998; Kawano et al., 1997). Cependant, du fait de sa structure, ce glycolipide ne peut pas être le ligand naturel des NKTi humaines car chez les mammifères, le premier glucide est toujours greffé sur le céramide par une liaison β .

- Lipides du soi

Les cellules NKTi présentent une activité anti-tumorale en absence d'antigène exogène (Smyth et al., 2001). De plus, le phénotype mémoire des NKTi du sang de cordon

humain sous-entend une activation antérieure, ce qui montre l'existence d'un antigène endogène pour ces cellules (D'Andrea et al., 2000).

Les phosphatidylinositols sont les principaux ligands du CD1d dans le RE mais ne sont pas antigéniques pour les NKTi (Joyce et al., 1998; Kang and Cresswell, 2004; Park et al., 2004). *In vitro*, des phospholipides reconnus par des hybridomes des cellules NKTi ont été identifiés, mais aucune population NKTi spécifique n'a pu être identifiée *in vivo*. Cependant, le développement des NKTi n'a pas lieu chez les souris dépourvues de la glucosylcéramide synthétase, ce qui suggère que le ligand endogène est un glycolipide ayant pour précurseur le glucosylcéramide, lui-même non reconnu par les NKTi (Stanic et al., 2003).

Récemment, l'équipe de A. Bendelac a identifié un antigène endogène potentiel des cellules NKTi. Après avoir montré que l'absence de glycolipides de la série des gangliosides n'affectait pas le développement des NKTi, la reconnaissance de l'iGb3 dans le contexte du CD1d par des NKTi murins et humains a été mise en évidence (Zhou et al., 2004b). L'iGb3 synthase étant un membre de la famille GT6, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'antigène iGb3 dans la suite de notre étude.

Le GD3 est un ganglioside fortement exprimé sur les mélanomes humains et faiblement sur les tissus sains humains et murins. Wu et ses collaborateurs ont montré que suite à l'immunisation de souris avec un mélanome humain exprimant le GD3, une réponse NKTi dépendante du CD1d se développait. Après une production rapide d'IFN- γ , d'IL-4 et d'IL-10, seules les deux dernières cytokines se maintiennent après 14 jours, orientant la réponse anti-tumorale vers un profil Th2 (Wu et al., 2003).

- Lipides microbiens

Deux glycosphingolipides, l' α galacturonylecéramide et l' α glucuronylecéramide, ont été isolés de la paroi d' α protéobactéries Gram⁻. Leurs structures biochimiques sont très proches de celle de l' α galactosylecéramide et ils activent les cellules NKTi (Kinjo et al., 2005; Mattner et al., 2005). La structure similaire de l' α galactosylecéramide et des glycolipides bactériens pose la question de l'origine de l' α galactosylecéramide dans les éponges marines. Il

est possible que son expression dans les éponges marines soit due à leur contamination par des α protéobactéries.

Les mycobactéries produisent du phosphatidylinositol-tétramannoside (PIM₄) dans leurs membranes interne et externe. Le chargement des CPA avec ce glycolipide active spécifiquement des NK_{Ti} et induit la production d'IFN- γ , cytokine impliquée dans l'immunité anti-microbienne (Fischer et al., 2004).

2- Interaction des NK_{Ti} avec le glycolipide

a/ Caractéristiques phénotypiques des NK_{Ti}

- TCR invariant

Le TCR des cellules NK_{Ti} présente des caractéristiques structurales très conservées chez les mammifères, compatibles avec la reconnaissance d'un ensemble restreint d'antigènes.

Les lymphocytes T conventionnels expriment à leur surface un TCR présentant une grande variabilité, indispensable à la reconnaissance d'un large spectre antigénique. Dans un premier temps, la recombinaison somatique entre les segments V et J du gène codant pour la chaîne α du TCR, ou V_D et J du gène codant pour la chaîne β , est génératrice de diversité du fait de la recombinaison aléatoire entre les segments (diversité jonctionnelle). Le deuxième niveau de diversité réside dans l'association aléatoire entre une chaîne α et une chaîne β pour former le TCR (diversité combinatoire).

Le TCR des cellules NK_{Ti} a la particularité de ne présenter ni diversité combinatoire ni diversité jonctionnelle. Chez la souris, la chaîne TCR α invariante, V α 14J α 18, est associée à V β 8, V β 7 ou V β 2. Chez l'Homme, on retrouve une population similaire avec un chaîne V α 24J α 18 (orthologue de V α 14J α 18 de la souris) associée à V β 11 (orthologue de V β 8 murin) (Kashiwase et al., 2003; Lantz and Bendelac, 1994). De plus, chez la souris, la boucle CDR3 α ne présente pas de variation dans sa région N terminale. Il n'y a donc aucune diversité combinatoire ou jonctionnelle au niveau de la chaîne α du TCR (Lantz and Bendelac, 1994). Cependant, si le répertoire TCR V β est réduit, les cellules NK_{Ti} présentent une diversité considérable des jonctions CDR3 β (Matsuda et al., 2001).

- Profil d'expression membranaire des NKTi

Les cellules NKTi présentent un phénotype intermédiaire entre les lymphocytes T et les cellules NK. Il semble que les cellules NKTi acquièrent un phénotype mémoire activé avant la naissance caractérisé par la forte expression de CD44 et de CD69 (Brigl and Brenner, 2004; D'Andrea et al., 2000; van Der Vliet et al., 2000). Ce phénotype mémoire est associé à une augmentation de l'expression des marqueurs des cellules NK : CD161, CD122, récepteurs de la famille des NKC (Natural Killer Complex) et Ly49 chez la souris (NK1.1 par exemple); récepteurs NKC (type lectine C) et KIR (Killer cells Ig like Receptor) chez l'Homme.

Les NKTi murins peuvent ou non exprimer le CD4 à leur surface, mais n'expriment pas le CD8 (Matsuda et al., 2000). Le rôle de la molécule CD4 sur les fonctions des NKTi, qui ne dépendent pas du CMH II, n'est pas connu. De même, les NKTi humains sont CD4⁺/CD8⁻ ou CD4⁻/CD8⁻. Cinquante pour cent des NKTi humains expriment la sous unité α du CD8, mais aucun n'exprime la sous unité β (Gumperz et al., 2002).

b/ Interaction du TCR avec le complexe CD1d-glycolipide

L'interaction du TCR avec la molécule CD1d, présentant un antigène glycolipidique, permet une activation rapide des cellules NKTi. Pour reconnaître l'antigène chargé sur le CD1d, le TCR s'oriente en diagonale par rapport à l'axe longitudinal du CD1d, de façon comparable à l'interaction du TCR des lymphocytes T conventionnels avec le CMH I (Burdin et al., 2000). Des études de l'interaction du TCR avec l' α galactosylcéramide ont montré une implication majoritaire du TCR α (Gumperz et al., 2000). Cependant, à la vue de la grande variabilité de réponse des hybridomes V α 14J α 18 vis-à-vis du soi, il semblerait que la chaîne β participe à la spécificité de reconnaissance des antigènes du soi par les NKTi.

L'interaction du TCR avec le complexe CD1d/glycolipide dure plus longtemps que celle d'un TCR $\alpha\beta$ conventionnel avec le complexe CMH/peptide et est de plus forte affinité, ce qui pourrait être dû à la structure même de l'antigène reconnu, mais aucune étude n'a apporté de réponse à cette hypothèse (Sidobre et al., 2002; Sim et al., 2003).

E- Physiologie des NKTi

1- Développement intrathymique

La différenciation des précurseurs hématopoïétiques en NKTi a lieu dans le thymus (Figure 13) (Gapin et al., 2001). Jusqu'au stade de cellules $CD4^+/CD8^+$ (double positif = DP), le développement suit celui des lymphocytes T conventionnels. Il y a un réarrangement au hasard des segments géniques des loci du $TCR\beta$, puis du $TCR\alpha$.

Ensuite, les cellules DP précurseurs des NKTi sont sélectionnées par les thymocytes corticaux exprimant à leur surface un glycolipide du soi chargé sur le CD1d (Coles and Raulet, 2000; Dao et al., 2004). Les souris invalidées pour l'hexosaminidase, permettant la transformation de l'iGb4 en iGb3, n'ont pas de NKTi. Il est donc possible que l'iGb3 soit impliqué dans la sélection des NKTi murins, mais cela n'a pas été confirmé chez l'Homme (Zhou et al., 2004b). Le rôle du CD1d dans la sélection positive a été montré par l'absence de NKTi chez des souris n'exprimant pas CD1d. La sélection négative des NKTi (élimination des NKTi trop affins) se ferait par la présentation d'un antigène de forte affinité par les CPA $CD1d^+$ ou par la surexpression de CD1d (Chun et al., 2003; Pellicci et al., 2003).

Après sélection, les thymocytes NKTi précoces sont $CD4^+$ ou $CD4^-/CD8^-$ (double négatif), $CD44^-$, $NK1.1^-$. Dans le thymus, les NKTi deviennent $CD44^+$, ce qui s'accompagne de l'acquisition de l'immunocompétence, c'est-à-dire qu'ils peuvent synthétiser de l'IL-4 et de l'IFN- γ suite à une stimulation antigénique (Benlagha et al., 2002; Pellicci et al., 2002).

Enfin, l'expression des marqueurs de cellules NK ($NK1.1$, Ly49, CD122) et l'arrêt de la prolifération marque la maturation des cellules NKTi qui a lieu en périphérie pour la majorité des NKTi ou bien dans le thymus (Benlagha et al., 2002; Pellicci et al., 2002).

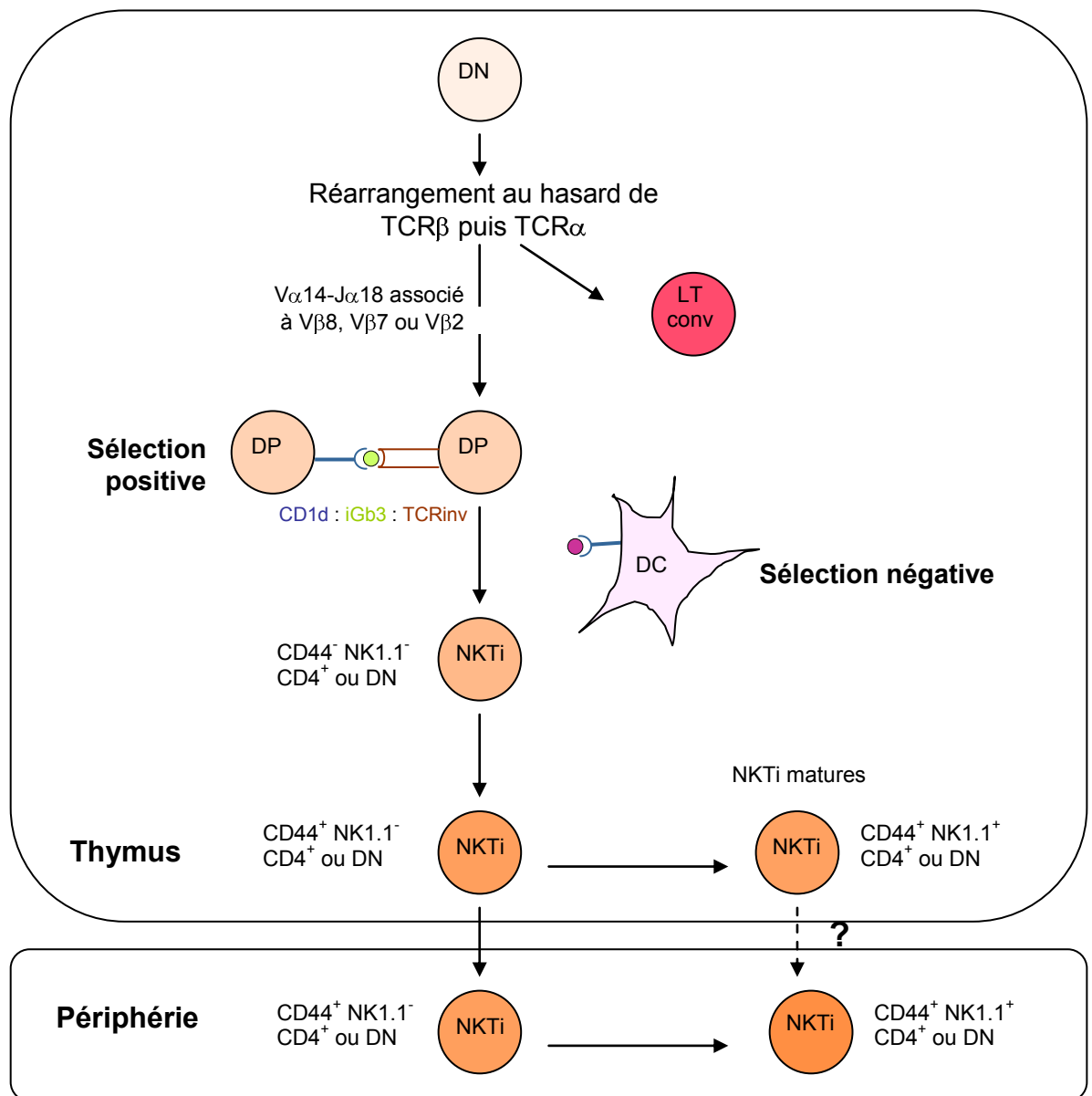


Figure 13 : Développement intra-thymique des NKTi chez la souris. D'après (Brigl and Brenner, 2004).

2- Localisation cellulaire, fréquence et recrutement

Chez la souris, les NKTi représentent 0,5% à 1% des LT dans le thymus, 1 à 2% dans la rate, 0,5% dans les ganglions lymphatiques, 35% dans le foie, 0,5% dans la moelle osseuse, et 1% des lymphocytes épithéliaux (Matsuda et al., 2000). Chez l'Homme, la répartition et la

proportion des NKTi sont semblables, sauf dans le foie où les NKTi sont moins nombreux que chez la souris (Gumperz et al., 2002).

La localisation des NKTi est contrôlée par l'expression de récepteurs de chimiokines permettant le recrutement des NKTi sur le site inflammatoire. Ainsi, chez l'Homme, 50% à 90% des NKTi expriment CCR5, CXCR3, CXCR6 associés à la migration sur des sites inflammatoires. Au contraire, seuls 20% des NKTi expriment CCR7 et pratiquement aucun n'exprime CCR5. Ces deux récepteurs sont nécessaires à la migration dans les zones T et B des organes lymphoïdes (Gumperz et al., 2002; Kim et al., 2002; Lee et al., 2002; Thomas et al., 2003). Le recrutement des NKTi sur le site infectieux ou inflammatoire est rapide mais le mécanisme n'est pas connu. Il semble que le CD1d ne soit pas mis en jeu (Mempel et al., 2002).

3- Activation et fonctions effectrices

a/ Profil d'expression cytokinique et activité cytotoxique

Chez l'Homme et chez la souris, les cellules NKTi sécrètent de grandes quantités de cytokines quelques minutes après la stimulation : IFN- γ , IL-4, IL-2, TNF- α , IL-5, IL-10, IL-13 et GM-CSF (Arase et al., 1993b ; Gumperz et al., 2002; Yoshimoto and Paul, 1994). En fait, les cellules expriment constitutivement l'ARN messager codant pour l'IL-4 et l'IFN- γ . Ceci pourrait expliquer la sécrétion rapide de cytokines après stimulation (Matsuda et al., 2003).

Les cellules NKTi ont un rôle de lyse vis à vis des cellules exprimant leur antigène cible. Leur cytotoxicité est médiée par les récepteurs FasL et TRAIL (TNF- Related Apoptosis Inducing Ligand) ou bien par l'exocytose de granules contenant de la perforine, des granzymes, ou même de la granulysine chez l'Homme (peptide anti-microbien) (Gansert et al., 2003; Kawano et al., 1998; Metelitsa et al., 2001; Nieda et al., 2001). La cytotoxicité directe des cellules NKTi est amplifiée par l'IL-2 et l'IL-12 (Arase et al., 1993a ; Hashimoto et al., 1995).

b/ Implication dans la balance Th1 et Th2

La réponse *in vivo* des cellules NKTi semble être influencée par l'environnement cytokinique local au moment de l'activation. La présence d'IL-12 augmente la production d'IFN- γ et oriente les NKTi vers une réponse Th1 (Kawamura et al., 1998). Au contraire, les cytokines IL-7 et IL-18 favorisent la sécrétion de cytokines de type Th2 (Hameg et al., 1999; Leite-De-Moraes et al., 2001; Yoshimoto et al., 2003).

La nature du ligand ou la dose d'antigène utilisée influence l'orientation de la réponse. Il semblerait que la longueur de la chaîne lipidique influe sur la sécrétion cytokinique des cellules NKTi. Ainsi, l'utilisation d'un glycolipide dérivé de l' α galactosylcéramide portant une chaîne sphingosine tronquée ou un acide gras substitué par une chaîne plus courte non saturée oriente l'expression cytokinique des NKTi vers un profil Th2 (Yu et al., 2005). Par ailleurs, l'administration à des souris d'une ou plusieurs doses d' α galactosylcéramide induit respectivement la production soit d'IFN- γ et d'IL-4, soit de cytokines de type Th2 (Matsuda et al., 2003) ; (Burdin et al., 1999; Singh et al., 1999). Au contraire, lors de la stimulation de cellules NKTi avec PIM₄, on assiste à la production d'IFN- γ et donc à une orientation de la réponse vers un profil Th1 (Fischer et al., 2004).

L'expression du corécepteur CD4 intervient également dans l'orientation de la réponse cytokinique. Les cellules CD4⁻ produisent des cytokines de type Th1 et de la perforine après activation. Au contraire, les cellules CD4⁺ produisent des cytokines de type Th1 et Th2 (Gumperz et al., 2002 ; Lee et al., 2002; Sandberg et al., 2003).

c/ Interaction avec d'autres types cellulaires

Les cellules NKTi ont une activité immunomodulatrice du fait de leur sécrétion rapide de cytokines qui activent en cascade de nombreux types cellulaires : DC, macrophages, cellules NK, LT, LB, polynucléaires neutrophiles (Figure 14).

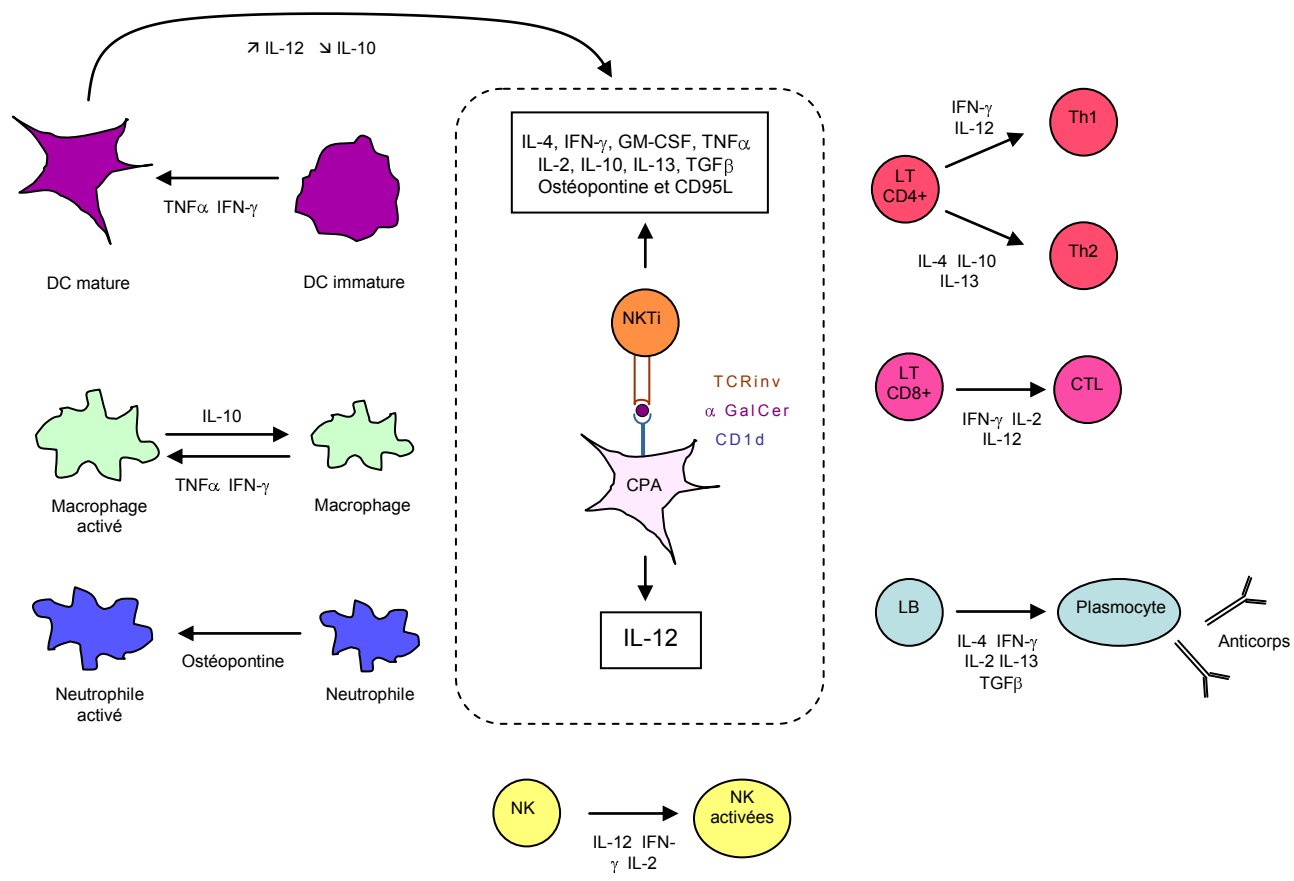


Figure 14 : Interaction des cellules NKTi avec d'autres types cellulaires suite à leur activation par l' α galactosylcéramide. D'après (Brigl and Brenner, 2004).

La présentation de l' α galactosylcéramide aux NKTi entraîne la production par ces dernières d'IFN- γ et l'augmentation de l'expression de surface de CD40-L qui interagit avec CD40 sur les DC. Ces deux phénomènes induisent la maturation des DC et leur sécrétion d'IL-12 (Fujii et al., 2003; Kitamura et al., 1999; Vincent et al., 2002). L'IL-12 produite par les DC et les cytokines sécrétées par les NKTi activent les cellules de l'immunité innée et acquise, comme indiqué sur la figure.

4- Devenir des NKTi après activation

Après leur activation, il semble que les cellules NKTi meurent par apoptose, mais l'importance de cette AICD (Activation Induced Cell Death) est controversée (Fujii et al., 2002). Au contraire, des études ont montré une persistance des NKTi après activation, mais

ces cellules présentent une diminution de l'expression de CD161 et du TCR à leur surface (Wilson et al., 2003).

F- NKTi et pathologies

1- NKTi et infections bactériennes

Lors d'une infection bactérienne, les NKTi interviennent principalement par la production d'IFN- γ . Les NKTi peuvent être activés soit par un antigène bactérien exogène, soit par un antigène endogène situé dans un contexte particulier (Mattner et al., 2005). Lors d'une infection avec des alpha-protéobactéries Gram⁻ LPS⁻ telles que *Ehleria muris* et *Sphingomonas capsulata*, les NKTi sont activés suite à la reconnaissance des α glycosphingolipides de la paroi des bactéries (Kinjo et al., 2005; Mattner et al., 2005). Au contraire, en présence de bactéries Gram⁻ LPS⁺, telle que *Salmonella thyphimurim*, les DC sont activées par le LPS, via les TLR (Toll Like Receptor) et activent les NKTi par la présentation de l'iGb3. Dans ce cas, la production d'IL-12 par les DC, suite à l'activation par le LPS, permet d'amplifier l'activation des NKTi par le lipide endogène (Brigl et al., 2003) (Figure 15).

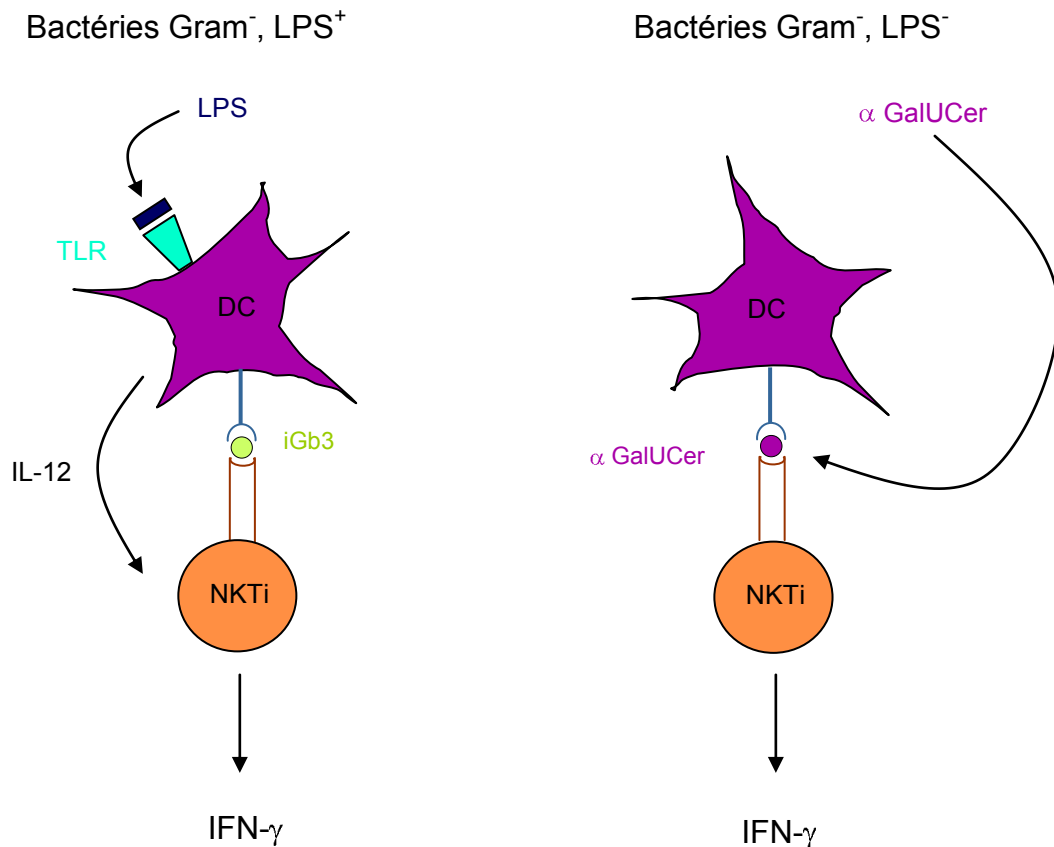


Figure 15 : Réponse anti-bactérienne des NKTi dépendante ou non du LPS. D’après (Mattner et al., 2005).

Bien que fortement suggérée, l’implication des cellules NKTi dans la réponse à une infection par *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* n’a pas été clairement démontrée. Un ligand des cellules NKTi murines et humaines, PIM₄, a été identifié sur la paroi des mycobactéries (Fischer et al., 2004). De plus, l’injection sous cutanée de lipides de la paroi des mycobactéries chez des souris sauvages entraîne la formation de granulomes, alors que les souris NKTi^{-/-} n’en développent pas (Apostolou et al., 1999). Chez l’Homme, les NKTi activés *in vitro* par l’α galactosylcéramide libèrent de la granulysine au contact de phagocytes infectés par *M. tuberculosis*. Cette lyse est dépendante de CD1d (Gansert et al., 2003).

La défense des souris contre les infections avec *Pseudomonas aeruginosa* met en jeu les cellules NKTi. En effet, les souris KO CD1d^{-/-} sont plus sensibles à l’infection, alors que l’administration d’α galactosylcéramide à des souris sauvages avant l’infection augmente la clairance vis-à-vis de la bactérie (Nieuwenhuis et al., 2002).

2- NKTi et infections virales

Lors de l'herpès, l'absence de cellules NKTi semble être un facteur aggravant de la maladie. En effet, les souris KO NKTi^{-/-} sont plus sensibles au virus de l'herpès simplex (HSV-1) (Grubor-Bauk et al., 2003). Par ailleurs, les souris KO CD1d^{-/-} montrent une mortalité accrue face au virus de l'herpès génital (HSV-2). Il semble que la production rapide d'IFN- γ en réponse au virus soit nécessaire pour mettre en place l'immunité anti-virale (Ashkar and Rosenthal, 2003).

Au contraire, l'infection de souris par le virus respiratoire syncytial (VRS) montre un rôle délétère des lymphocytes CD1d restreints. En effet, les symptômes de cette maladie sont plutôt dus à la réponse immunitaire dirigée contre le VRS plutôt qu'à l'effet cytopathogène direct du virus. L'intensité de la réponse des LT CD8⁺ contre ce virus est liée à la présence de lymphocytes CD1d restreints. Chez des souris invalidées pour le CD1d, la pathologie est moins marquée (Johnson et al., 2002).

Le virus VIH-1 entraîne une immunodéficience par l'infection des cellules du système immunitaire exprimant le récepteur CD4. Les cellules NKTi CD4⁺ sont donc sensibles à cette infection. La quantité de lymphocytes CD1d restreints diminue fortement dès la première année suivant la séroconversion (Motsinger et al., 2002). Par ailleurs, les protéines Nef et gp120^{env} de VIH-1 interagissent avec le CD1d et causent une nette réduction du niveau de son expression membranaire (Cho et al., 2005 ; Hage et al., 2005).

Les NKTi sont également impliqués dans la réponse dirigée contre le virus d'Epstein-Barr (EBV). Les individus déficients pour la protéine SAP et les souris KO SAP^{-/-} présentent une sensibilité particulière au virus, associée à un défaut de développement des NKTi (Pasquier et al., 2005).

Des rôles différents des cellules NKTi dans l'immunité anti-virale ont donc été démontrés. Les cellules restreintes par le CD1d sont impliquées tant dans la mise en place de la réponse immunitaire innée que de la réponse immunitaire acquise (HSV). Par ailleurs, le rôle inflammatoire des cellules NKTi peut être un facteur aggravant de la maladie (comme

c'est le cas pour les VRS), alors qu'elle peuvent présenter une activité immunomodulatrice dans le cas de la réponse à l'EBV.

3- NKTi et infections parasitaires

La lignée murine BALB/c est naturellement résistante au paludisme. Après infection par des globules rouges parasités par *Plasmodium berghei*, des souris BALB/c KO CD1d^{-/-} développent un neuropaludisme léthal associé à une augmentation des niveaux sériques de cytokine proinflammatoires IFN- γ et TNF- α (Hansen et al., 2003).

Lors d'une infection par *Schistosoma mansoni*, la présentation de glycoconjugués parasitaires indéterminés par les molécules CD1d amplifie la réponse T de type Th2. Les lymphocyte T de souris CD1d^{-/-} produisent moins de cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et d'anticorps IgG1 (Faveeuw et al., 2002). Il n'y a cependant pas d'influence de l'expression ou non du CD1d sur la survie des vers ou sur leur fécondité.

Les cellules NKTi semblent également être impliquées dans la réponse à *Leishmania donovani*, par la sécrétion rapide d'IFN- γ car des souris KO CD1d^{-/-} montrent une susceptibilité accrue à l'infection (Amprey et al., 2004).

4- NKTi et autoimmunité

Les cellules NKTi jouent un rôle bivalent dans l'auto-immunité. D'une part elles maintiennent la tolérance aux antigènes du soi, et d'autre part elles sécrètent des cytokines inflammatoires qui peuvent entraîner le développement d'une réponse auto-immune.

Les souris NOD (NonObese Diabetic) développent naturellement un diabète auto-immun qui se rapproche du diabète de type 1 chez l'Homme et sont utilisées pour l'étude de cette maladie auto-immune. Il semblerait que ces souris présentent un déficit en NKTi (Baxter et al., 1997 ; Godfrey et al., 1997; Gombert et al., 1996). De plus, des souris NOD CD1d^{-/-} présentent une forme plus grave de la maladie (Naumov et al., 2001; Wang et al., 2001) qui est améliorée par le transfert adoptif de cellules CD1d restreintes (Baxter et al., 1997). La protection contre le diabète par les NKTi serait conférée par le basculement de la réponse

immunitaire vers un profil Th2 dans les îlots pancréatiques (Hammond et al., 1998), et par une inhibition de la transformation des cellules T autoréactives en cellules effectrices (Beaudoin et al., 2002). Chez l'Homme, deux études montrent que les NKTi sont moins nombreux et présentent une fonctionnalité réduite chez les individus souffrant d'un diabète de type 1 (Kukreja et al., 2002; Wilson et al., 1998). Ces données sont cependant sujettes à controverses (Lee et al., 1998; Oikawa et al., 2002).

Les souris SJL développent de façon chronique des EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis), un modèle murin de la sclérose en plaque. Ces souris présentent une déficience numérique en cellules T CD161⁺, de façon similaire à ce qui a été observé chez les souris NOD (Yoshimoto et al., 1995) qui sont également sensibles à cette maladie. L'expression transgénique de NKTi dans ces souris diminue la sécrétion d'IFN- γ due à la reconnaissance spécifique d'un autoantigène et protège ces souris de la maladie (Mars et al., 2002). Cette protection est indépendante de l'IL-4. Par ailleurs, l'administration d' α galactosylcéramide protège les souris de l'EAE (Singh et al., 2001) Il semblerait que la protection à la maladie soit assurée par la capacité des NKTi à moduler la balance des cytokines IL-4 / IFN- γ (Yoshimoto et al., 2003).

5- NKTi et cancer

a/ Chez la souris

- Réponse anti-tumorale induite

L'activation des cellules NKTi par l'IL-12 et l' α galactosylcéramide permet le développement d'une réponse anti-tumorale. Dans ce cas, il semble qu'il y ait une interdépendance entre l'IL-12 et les cellules NKTi. En effet, si les cellules NKTi sont nécessaires à l'activité de l'IL-12 (Cui et al., 1997; Shin et al., 2001) la réciproque est vraie (Hayakawa et al., 2001); (Nakagawa et al., 2001). Après activation par l' α galactosylcéramide, les cellules NKTi produisent de l'IFN- γ , et augmentent l'expression de CD40L à leur surface. Ces deux phénomènes activent les DC qui vont ensuite produire de l'IL-12 nécessaire à l'activité anti-tumorale et anti-métastatique des NKTi par l'activation d'autres effecteurs de l'immunité anti-tumorale (Figure 16). Il semble que l'activité anti-tumorale des cellules NKTi soit médiée

principalement par la synthèse d'IFN- γ et d'IL-12. L'efficacité du rejet de la tumeur est augmentée quand les cellules NKTi sont activées suite à l'injection de DC directement chargées avec l' α galactosylcéramide plutôt que par l'implication du glycolipide seul (Fujii et al., 2002; Toura et al., 1999).

Les cellules NKTi participent également à l'immunité anti-tumorale suite à une vaccination. En effet, l'immunisation de souris KO NKTi -/- avec un antigène spécifique de tumeur ou avec des cellules tumorales irradiées ne permet pas de réponse efficace contre la tumeur. La maturation incorrecte des DC dans les souris KO NKTi -/- serait responsable de ce phénomène (Gillesen et al., 2003; Stewart et al., 2003).

- Immunosurveillance naturelle

L'étude de tumeurs induites par le méthylchlorantrène (MCA) a montré un rôle anti-tumoral des NKTi en l'absence de stimulation exogène par l' α galactosylcéramide ou l'IL-12. Dans ce cas, il semble que les cellules NKTi produisent de l'IL-12 et de l'IFN- γ , mais pas de perforine (Smyth et al., 2001). Leur rôle serait donc l'activation des effecteurs anti-tumoraux tels que les cellules NK et les LT CD8⁺ (Figure 16).

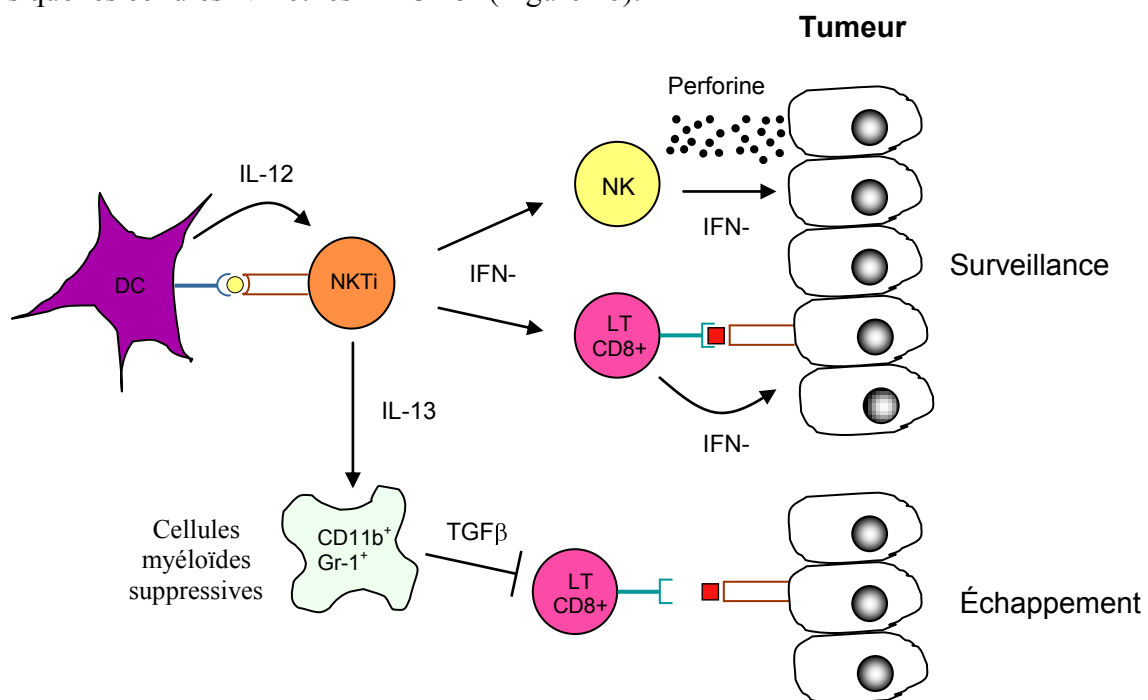


Figure 16 : Implication des cellules NKTi dans l'immunosurveillance naturelle. D'après (Brigl and Brenner, 2004).

L'intervention des cellules NKTi nécessite leur reconnaissance d'un antigène endogène, exprimé par la tumeur. Par exemple, les mélanomes humains expriment le GD3 qui pourrait être un ligand des cellules NKTi murines. Les cellules tumorales n'exprimant pas toujours le CD1d, une présentation croisée du GD3 par des cellules présentatrices d'antigènes CD1d+ est mise en jeu (Wu et al., 2003). Cette étude a été réalisée chez la souris avec des cellules tumorales humaines, il n'est pas certain que les NKTi humains réagissent de façon similaire face au mélanome.

b/ Chez l'Homme

Après activation par l' α galactosylcéramide, les NKTi humains ont une activité anti-tumorale directe ou indirecte. Les NKTi peuvent tuer directement la cellule tumorale par la sécrétion de perforine et de granzyme, ou bien par l'intermédiaire de TNF- α , FasL, ou TRAIL (Gansuvd et al., 2002; Nicol et al., 2000). Par ailleurs, la production d'IL-2 et d'IFN- γ par les NKTi permet l'activation des cellules NK (Ishihara et al., 2000; Metelitsa et al., 2001). De même que chez la souris, les cellules NKTi activent la sécrétion d'IL-12 par les DC, ce qui contribue à leur propre activité anti-tumorale (Vincent et al., 2002).

Des essais cliniques d'activation de la réponse NKTi par l' α galactosylcéramide ont été réalisés. Un essai de phase I a été effectué, par l'injection d' α galactosylcéramide chez des patients présentant des tumeurs solides. Le glycolipide synthétique a été toléré et une réponse cytokinique a été observée chez certains patients. Cependant, aucune réponse clinique n'a été enregistrée (Giaccone et al., 2002). Une seconde étude clinique de phase I a été réalisée avec des cellules dendritiques chargées avec l' α galactosylcéramide. Le traitement a été bien toléré et dans deux cas sur onze, une réponse significative des NKTi a été observée (Ishikawa et al., 2005). Une autre étude réalisée par l'équipe de Steinman a montré que l'injection de cellules dendritiques matures chargées avec le KRN7000 permettait une augmentation du taux de NKTi d'un facteur 100 jusqu'à six mois après l'injection. Cette étude est encourageante car tous les patients traités ont présenté la même réponse. Il semble donc que l'amplification, *in vivo*, des NKTi soit réalisable (Chang et al., 2005).

L'activation des cellules NKTi par l' α galactosylcéramide ou l'IL-12 permet la mise en place d'une réponse anti-tumorale. Cependant, aucune donnée ne permet d'évaluer l'implication des cellules NKTi dans l'immunité anti-tumorale naturelle chez l'Homme et l'intérêt thérapeutique reste à évaluer par des essais de phases plus avancées.

I- Présentation de l'étude

J- Antigènes A et B incompatibles dans les cancers

La modification de l'expression des antigènes de groupe sanguin est un phénomène souvent observé dans les cancers (Le Pendu et al., 2001). Nous nous intéressons plus particulièrement à l'expression incompatible des antigènes A et B (1 à 15% des carcinomes), identifiés dans des carcinomes colorectaux, gastriques, pancréatiques, bronchiques, mammaires, et ovariens (Hattori et al., 1987; Kawai et al., 1993; Metoki et al., 1989; Nakagoe et al., 1991; Pour et al., 1988; Yuan et al., 1985). Ils peuvent être considérés comme des alloantigènes très immunogènes dans le cadre d'une transfusion sanguine ou d'une transplantation tissulaire. Il semble qu'il y ait une plus forte incidence des adénocarcinomes gastriques et ovariens chez les individus de groupe sanguin A. Hakomori a donc supposé que l'expression de l'antigène A incompatible, hautement immunogénique, dans les tumeurs des individus de groupe O et B entraînait une réponse anticorps et empêchait ainsi leur croissance (Hakomori et al., 1967). Si l'enzyme synthétisant cet antigène A incompatible était effectivement exprimée uniquement dans ces tumeurs, cet antigène constituerait une cible d'immunothérapie spécifique.

Le mécanisme permettant la synthèse des antigènes A et B incompatibles n'est pas connu. Après avoir pensé qu'il s'agissait d'un phénomène artéfactuel (réaction croisée avec des antigènes apparentés comme Tn ou Forssman), les structures antigéniques A et B ont clairement été identifiées par spectrographie de masse et RMN chez des individus homozygotes pour l'allèle O (Metoki et al., 1989). Par la suite, une activité enzymatique spécifique, synthétisant l'antigène A, a été détectée à partir d'un carcinome gastrique de patient génotypé O / O (David et al., 1993). Les auteurs ont alors suggéré qu'un épissage alternatif de l'ARN messager codant pour la glycosyltransférase A permettrait la restauration d'une activité GalNAc transférase dans ces cellules. Cependant, l'épissage de l'exon 6 (portant la mutation responsable de l'inactivation de l'allèle O1) entraîne un changement du cadre de lecture. De plus, l'exon 6 code pour une partie du domaine catalytique indispensable pour l'activité de la glycosyltransférase A (Yazer and Palcic, 2005). Ces observations invalident donc l'hypothèse de l'épissage alternatif. De son côté, Yamamoto a suggéré que des mutations ou des corrections du cadre de lecture des gènes *B* ou *O* pourraient également

permettre d'expliquer la présence de cet antigène A incompatible mais cette hypothèse n'a pas été confirmée (Yamamoto, 1995).

Des études antérieures ont montré l'expression tissulaire différentielle des antigènes A et B chez le rat (Cailleau-Thomas et al., 2002). Nous proposons donc une nouvelle hypothèse permettant d'expliquer l'existence des antigènes A et B incompatibles. Il existerait un gène autre que le gène *ABO* codant pour une enzyme responsable de la synthèse des antigènes A et B incompatibles. C'est pourquoi nous cherchons tout d'abord à identifier le gène responsable de cette synthèse dichotomique des antigènes A et B chez le rat, afin d'étudier par la suite la présence éventuelle d'un gène orthologue chez l'Homme.

K- Présentation de la famille GT6 chez le rat

Plusieurs membres de la famille GT6 ont été caractérisés chez le rat : l'iGb3 synthase (Keusch et al., 2000b), l' α 1,3-galactosyltransférase (Taylor et al., 2003) et la glycosyltransférase A (Cailleau-Thomas et al., 2002). Ce sont des protéines transmembranaires de type II avec un court domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire, une tige et un large domaine catalytique. Leur appartenance à la famille GT6 a été définie par l'alignement de leurs séquences protéiques (Figure 17).

Alpha3GalT	1	MVTMPQDLHVKVSMSRSKSETSLSSRSQSQEKIMNVKGIILSVLMVSTVLVVFWEYVN
iGb3s	1	-----MALEGLRAKKELLWRFLSAFGLLGLYHYWF
Enz A	1	-----MDLRGRPKCYSLHLGILPFIVLVLVFFGYGF
Alpha3GalT	61	RTHSYQBEDIERAREKGRNGDSIVEPQLWDWFPKNRP-----EVLTVTPWKAPIVW
iGb3s	32	KIFRLFEVFIPMG-ICPMAIMPLLKDNFTGVLRHWARP-----EVLTCISWGAPIIW
Enz A	32	LSHKIQEFERNPGGETCMATRQTDVQKVVSVPRLMAYPQPNVLTPIRNDVLVFTPWLAIIW
Alpha3GalT	113	EGTYDTALLEKYYAROKITVGLTVFAVGKYIEHYLEDFLESANKYFMVGHVIFIVMMDD
iGb3s	83	DETFDPHVAEREARRONLTIGLTVFAVGKYLEKYLEHFLVSAEQYFMVGNVYYYVFTDR
Enz A	92	EGTFNIDILNEQFKLQNTTIGLTVFALKKYVV-FLKLFLETAEQHFVGHKVIYYVFTDR
Alpha3GalT	173	TSRMFAVHLSPLHSLOVFEIRSEKRWQDLSMMRMKTIGEHILDHIQHEVDFLCMDVDQV
iGb3s	143	PEAVPHVALGQGRLLRVKPVREKRWQDVSMARMLTTHFALGGQIGREADYVFCIDVDQY
Enz A	151	PSDVPQVPLGAGRKLVLTVRNYTRWQDVSMHRMEMISHFSEQRFQHEVDYIVCGDVMK
Alpha3GalT	233	FQDNFGVETLQQLVAQLQAWMYKASPDEFTYERRELSAAYIPFGEGDFYYHAAVFGGTPV
iGb3s	203	FSGNFGPEVLADLVAQLHAWHFRWPRWMLYERDKRSAAATSLSEGDFYYHAAVFGGSVA
Enz A	211	FSDHVGVETLSALFGLHPGFYRSRRSFTYERRPKSQAYIPRDEGDFYAGGFFGGSVV
Alpha3GalT	293	HILNLTRECFKGITQDKHDIEAQWHDESHNLNKYFLNKPTKILSPEYCWYDHIG-LPSD
iGb3s	263	ALLKLTAHCATGQQLDREHGIEARWHDESHNLNKKFWLSKPTKLLSPEFCWAEIIG-WRPE
Enz A	271	EVHHLTKACHQAMVEDQANGIEAVWHDESHNLKYLLEKPTKVLSPYVWDQKLLGWPSI
Alpha3GalT	352	IKNVKIAWQTKKEYNLVRSNV
iGb3s	322	IHHPRLIWAPKEYALVRT--
Enz A	331	MKKIRYVAVPKNHQATRN--

Figure 17 : Alignement des trois membres de la famille GT6 connus chez le rat.

Les gènes codant pour l'iGb3 synthase, l' α 1,3-galactosyltransférase et la glycosyltransférase A sont polyexoniques, les deux derniers exons codant pour le domaine catalytique. Le cadre ouvert de lecture couvre environ 1000 bases. Les locus *ABO* et *α 1,3-galactosyltransférase* sont localisés sur le chromosome 3q11-q12, orthologue du chromosome 9q34 humain. Le gène *iGb3 synthase* est quant à lui localisé sur le chromosome 5.

L'identification de la glycosyltransférase A a permis de mettre en évidence l'expression différentielle des antigènes A et B chez le rat BDIX (Tableau 9).

Tissu	Antigène A	Antigène B
Caecum	+++	+++
Cerveau	-	-
Estomac	++	++
Foie	-	-
Glande parathyroïdienne	+++	-
Glande parotide	+++	-
Glande sous-maxillaire	++	++
Glande thyroïdienne	+++	-
Gros intestin	+++	++
Intestin grêle	-	-
Langue	+++	-
Muscle	-	-
Nœud lymphatique	-	-
Œsophage	++	-
Ovaire	-	-
Pancréas	+++	++
Peau	-	-
Poumon	-	-
Rate	-	-
Rein	-	++
Testicule	-	-
Thymus	++	-
Trachée	-	-
Utérus	-	-
Vésicule séminale	+++	-
Vessie	-	-

Tableau 9 : Expression tissulaire des antigènes A et B chez le rat BDIX (d’après Cailleau-Thomas et coll., 2002).

Cette étude met en évidence l’expression tissulaire différentielle des antigènes A et B. De plus, quand ces antigènes sont localisés dans les mêmes tissus, leur localisation cellulaire n’est pas la même, sauf dans les pancréas où ils sont coexprimés. Par ailleurs, si l’antigène A

est exprimé sur des glycoprotéines et des glycolipides, l'antigène B par contre ne semble être exprimé que sur des glycolipides. La lignée de rats BDIX est consanguine et a été établie au Max Planck Institute de Berlin. L'expression des antigènes A et B ne peut donc pas être due à deux allèles *Abo*. Il semble par conséquent qu'un autre gène soit responsable de la synthèse des antigènes B chez ce rat.

D'autres études ont montré une expression différentielle de A et B lors du développement des cellules olfactives et des cellules ciliées de la cochlée (Gil-Loyzaga et al., 1989).

Le dernier membre de la famille GT6, la Forssman synthase, n'est pas fonctionnelle chez le rat. En effet, lors de la xénogreffe d'un organe de souris (Gustavsson et al., 1996; Gustavsson et al., 2001) ou de hamster (Brouard et al., 2000) sur un rat, des anticorps anti-Forssman dirigés contre les greffons sont produits. Ceci dénote l'absence de ces antigènes dans les tissus normaux de rat. Une séquence similaire au gène codant pour cette enzyme est présente sur le chromosome 3q12, mais il semble que ce soit un pseudogène. Pourtant, des études portant sur des tumeurs de rat ont montré la présence de glycolipides similaire à l'antigène Forssman dans des adénocarcinomes coliques (Falk et al., 1986) et dans des lignées tumorales de rat (Shigyo et al., 1986). Le mécanisme de synthèse de ces antigènes dans les tumeurs n'est pas connu.

Chez le rat, tous les membres connus de la famille GT6 ont été identifiés. Aucun ne permet la synthèse de l'antigène B. Il semble donc qu'il existe au moins un autre gène de cette famille remplissant ce rôle. Il est possible que son identification nous aide à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la synthèse des antigènes A et B incompatibles.

II- But de l'étude et résultats

Suite à l'identification du gène *ABO* codant pour la glycosyltransférase A de rat dans notre équipe, notre étude a permis d'identifier quatre nouveaux gènes de la famille GT6 : un deuxième locus *Abo* chez le rat, et trois gènes *GT6m5*, *GT6m6*, et *GT6m7*, également présents dans d'autres espèces. Ce travail a donné lieu à la rédaction de deux articles :

Article 1 : Lors de la caractérisation de la glycosyltransférase A de rat dans notre laboratoire (Cailleau-Thomas et coll., 2002), l'expression tissulaire différentielle des antigènes A et B a été mise en évidence. L'étude du polymorphisme ABO chez le rat a permis de montrer l'existence de plusieurs gènes *Abo* et d'identifier la glycosyltransférase B responsable de la synthèse de l'antigène B.

Article 2 : L'étude de la famille GT6 chez le rat a permis la caractérisation de nouveaux membres : GT6m5, GT6m6, et GT6m7. Ils sont présents dans plusieurs espèces et leur étude phylogénétique nous montre une évolution de la famille GT6 selon le modèle de « naissance et mort ».

L- Article 1 : Clonage d'un gène codant pour l'enzyme synthétisant l'antigène de groupe sanguin B de rat : les rats ont plus d'un gène ABO.

Le polymorphisme ABO chez le rat a été décrit à partir de lignées consanguines exprimant l'antigène A (Bouhours et al., 1995; Breimer et al., 1980). L'antigène B a été caractérisé dans ces mêmes lignées sur des glycolipides (Hansson et al., 1987). L'identification de la glycosyltransférase A de rat dans notre équipe a montré une expression tissulaire et cellulaire différente des antigènes A et B chez le rat BDIX (Cailleau-Thomas et al., 2002). Ces différentes observations nous ont conduits à étudier le mode de synthèse de l'antigène B dans ces animaux.

L'utilisation d'amorces PCR spécifiques de la séquence A1 de rat (AF264018) nous a permis d'amplifier une séquence de 630 pb dans 29 rats issus de 5 souches différentes : Wistar, Sprague Dawley, BN, Lewis et une souche d'un laboratoire japonais. Vingt-quatre de ces séquences se sont révélées identiques à l'allèle A1, mais 5 ont présenté des différences significatives avec celui-ci. Le clonage des séquences issues de 4 de ces souches montre l'existence de 4 séquences A différentes : A1, A2, A3 et A4.

Un alignement BLAST est réalisé avec la séquence A1, sur des EST de rat (Expressed Sequence Tag). Des séquences similaires à celle de la glycosyltransférase B sont isolées. Elles sont ensuite utilisées pour définir des amorces spécifiques afin d'isoler l'ADNc complet de ce gène, nommé *Abo2* (la séquence A1 étant nommée *Abo*).

Le gène *Abo2*, localisé sur le chromosome 3q11-q12 près du locus *Abo*, comporte un cadre ouvert de lecture de 1005 pb. Il est organisé en 6 exons. L'absence de l'exon correspondant à l'exon 4 du locus *Abo* pourrait expliquer la faible expression de l'antigène B. De plus, cet antigène n'a été mis en évidence, chez le rat, que sur des glycolipides. La tige plus courte de cette enzyme pourrait entraîner une spécificité différente de l'enzyme et donc la synthèse d'antigènes B glycolipidiques plutôt que glycoprotéiques.

L'activité catalytique de la protéine codée par le gène *Abo2* est mise en évidence par des tests enzymatiques avec des donneurs UDP-Gal ou UDP-GalNAc, et des accepteurs libres (2'fucosylactose) ou biotinylés (H type 3 –sp-biot). De plus, la transfection des ADNc *Abo* et *Abo2* dans des cellules CHO exprimant l'antigène H permet la synthèse respective des

antigènes A et B à la surface de ces cellules. Le gène *Abo2* code donc pour une glycosyltransférase B fonctionnelle.

L'expression tissulaire de l'antigène B a été décrite précédemment. Dans cette étude, nous démontrons que l'ARN messager de cette enzyme est présent de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus cependant que l'antigène est exprimé ponctuellement dans quelques tissus (estomac, pancréas, rein, caecum, gros intestin, glande sous maxillaire). Deux hypothèses peuvent expliquer l'absence de l'antigène B dans des cellules où l'ARN messager est présent :

- Absence de l'antigène H, précurseur nécessaire à la synthèse de l'antigène B.
- Régulation post-traductionnelle de la glycosyltransférase dans les tissus où l'antigène H et l'ARN messager sont présents (intestin grêle par exemple).

Cette étude a donc mis en évidence l'existence de plusieurs gènes codant pour les glycosyltransférases A et B chez le rat. A la vue des résultats présentés ici, les rats possèdent tous au moins un gène *Abo* mais leur nombre peut varier selon les souches. Par contre, quelque soit l'espèce de rat, le gène *Abo2*, codant pour la glycosyltransférase B, est présent en un seul exemplaire. Ceci pourrait expliquer pourquoi aucun rat de phénotype O n'a été identifié à ce jour.

Cloning of a rat gene encoding the histo-blood group B enzyme: rats have more than one *Abo* gene

Anne Laure Turcot², Antoine Blancher³, Béatrice Le Moullac-Vaidye², Stéphanie Despiau³, Jézabel Rocher², Francis Roubinet^{3,4}, Claude Szpirer⁵, and Jacques Le Pendu^{1,2}

²INSERM U419, Institut de Biologie, 9 Quai Moncousu, 44093, Nantes Cedex, France; ³Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, Université Paul Sabatier, Faculté de Médecine, Bâtiment A2, 133 Route de Narbonne, 31062, Toulouse, Cedex 4, France; ⁴Laboratoire d'Immunohématologie, Etablissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée, Avenue de Grande Bretagne, BP 3210, 31027, Toulouse, Cedex 3, France; and ⁵Université Libre de Bruxelles, IBMM, B-6041 Gosselies, Belgium

Received on April 11, 2003; revised on May 23, 2003; accepted on May 23, 2003

A genomic DNA fragment corresponding to exon 7 of the human *ABO* gene was amplified from rats of several inbred and outbred strains. Five different sequences were obtained, four of them corresponding to A-type sequences and one to a B-type sequence based on the amino acids equivalent to residues at positions 266 and 268 of the human enzymes. In rats from inbred strains, a single A-type sequence and the unique B-type sequence were found, whereas some animals of outbred strains presented two or three A-type sequences along with the B-type sequence. The complete coding sequence of the B-type gene was obtained; identification of the exon–intron boundaries, determined by comparison with rat genomic sequences from data banks, revealed that the rat B-type gene structure is identical with that of the mouse *Abo* gene. Compared with the human *ABO* gene and the rat A gene, it lacks exon 4. Like the rat A gene (symbol: *Abo*), the rat B gene (symbol: *Abo2*) is located on chromosome 3q11–q12. It could be shown by transfection experiments that the B-type cDNA encodes an active B transferase. A transcript of the B gene was found ubiquitously, whereas the B antigen was only detected in a restricted set of tissues. These data indicate that rats have at least two distinct *Abo* genes, one monomorphic gene encoding a B-specific enzyme and one or more genes in some cases encoding an A-specific enzyme.

Key words: ABO/antigen/galactosaminyltransferase/histo-blood group/rat

Introduction

ABO blood group antigens were discovered by Karl Landsteiner over a century ago on human red cells. Since

then, they have been evidenced on many other cell types and have been found to be secreted in biological fluids of humans as well as of many animal species (Watkins, 1999). Yet their expression at the surface of erythrocytes is restricted to humans and a few anthropoid apes (Blancher and Socha, 1997). The ABO and related antigens are carbohydrates that correspond to terminal structures of glycan chains of glycolipids and glycoproteins on cell surfaces and are also found as free oligosaccharides in some biological fluids, such as milk. In group A individuals the A enzyme adds an N-acetylgalactosamine on the H antigen to form the A antigen GalNAc α 1,3[Fuc α 1,2]Gal, whereas in B individuals a galactose is added by the B enzyme to give the B antigen Gal α 1,3[Fuc α 1,2]Gal. In humans, the A and B enzymes are encoded by different alleles at the single *ABO* locus. A third type of human *ABO* alleles, called O, is silent. Homozygous O individuals are of blood group O and display H precursor structures unmodified by A or B glycosyltransferase (Clausen and Hakomori, 1989).

The molecular genetic basis of the human *ABO* alleles has been elucidated. Although many mutations have been described to date, only some of these are functionally relevant (Olsson and Chester, 2001). Numerous silent O alleles have been evidenced (Kermarrec *et al.*, 1999; Roubinet *et al.*, 2001), other functional alleles coding for variants of A and B enzymes. The A and B alleles encode for very similar proteins, and functional analyses determined that the amino acids at positions 266 and 268 are critical in determining the enzyme donor substrate specificity, UDP-GalNAc versus UDP-Gal for the A and B enzymes, respectively. A enzymes are characterized by a leucine and a glycine at positions 266 and 268, respectively, whereas B enzymes have a methionine and an alanine, respectively, at these positions (Yamamoto, 2000). A recent analysis of the crystal structures and a modeling study of these enzymes showed that these two residues are positioned in the active site and contact the nucleotide-sugar donor; their relative size explains how the B enzyme accommodates UDP-Gal and how the A enzyme forms complementary interactions with UDP-GalNAc (Heissigerova *et al.*, 2003; Patenaude *et al.*, 2002).

The study of the molecular basis of A and B antigens expression in mammals other than humans could provide insights into the evolution of the ABO system and help decipher its biological meaning. The erythrocyte expression of ABO antigens is not constant in mammalian species. Among primates, erythrocyte expression is limited to humans and apes (chimpanzee, gorilla, orangutan, and gibbon). In other mammals, some pigs express A on erythrocytes due to passive absorption of A glycolipids in the red blood cell membrane. Contrary to the irregular expression of ABH antigen at the surface of red cells, tissue expression

¹To whom correspondence should be addressed; email: jlependu@nantes.inserm.fr

of ABH antigens has been evidenced in all mammalian species studied so far. The constant and main site of expression of ABO antigens appears to be the mucosae of the gut as well as of the upper respiratory and lower genitourinary tracts (Oriol *et al.*, 1992). Because of this expression on tissues in contact with the external environment, it has been speculated that these polymorphic antigens could play a role in relationship with pathogens. In this line, many associations between the ABO phenotype and infectious diseases have been described; in some selected cases it has been possible to demonstrate a modulation of the adhesion ability of bacteria strains by the A or B antigens, suggesting that their host range is influenced by the ABO blood group phenotype (Black *et al.*, 1987; Boren *et al.*, 1993; Geisel *et al.*, 1995; Glass *et al.*, 1985; Lindstedt *et al.*, 1991; Steuer *et al.*, 1995; Swerdlow *et al.*, 1994). Collectively these observations indicate that the ABO polymorphism could provide a mechanism of protection against pathogens at the level of the population and that there could exist a selective pressure to maintain diversity at the ABO locus (Marionneau *et al.*, 2001).

In all primate species studied so far, a single polymorphic ABO locus has been found, and sequence analysis revealed at least three independent appearances of B alleles from ancestral A alleles (Doxiadis *et al.*, 1998; Kominato *et al.*, 1992; Martinko *et al.*, 1993). In rats, genetic polymorphisms have been described with inbred strains expressing the A antigen throughout the intestine, other strains showing expression restricted to the large intestine, and yet other strains lacking A antigen expression in the gut (Bouhours *et al.*, 1995; Breimer *et al.*, 1980). In this species the B antigen can also be synthesized because it has been characterized on glycolipids (Hansson *et al.*, 1987). Recently, we reported the sequence of a gene encoding an A transferase from BDIX rats, and Hansson and colleagues found two rat A sequences in Sprague-Dawley rats (Cailleau-Thomas *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 2002). One of these was identical with the BDIX rat sequence, the other was 95% identical, and evidence was obtained suggesting that these two sequences were allelic. They will be referred to as rat A1 and A2. Homozygous rat strains showed only one of the two A sequences, yet these rats could express B antigen. In addition, the tissue distribution of the A and B antigens in rats is largely different (Cailleau-Thomas *et al.*, 2002), strongly suggesting that in this species, unlike in humans, the A and B antigens cannot be synthesized by alleles of the same gene. Two distinct rat α 1,3galactosyltransferases have already been described. These enzymes use as substrate non-fucosylated acceptors, N-acetyllactosamine units of glycoproteins and lactosylceramide, respectively (Taylor *et al.*, 2003). They do not appear to be able to synthesize B histoblood group epitopes. In this article, we report the cloning of a new rat gene, distinct from the A gene and from these α 1,3galactosyltransferases, encoding a functional B enzyme.

Results

Analysis of the rat A and B sequences polymorphisms

Using the pair of primers deduced from the A1 rat sequence (AB10 and 3'enzA), we amplified 630-bp amplicons from

29 animals, including 11 Wistar, 15 Sprague Dawley, 1 BN, 1 Lewis, and 1 rat from a Japanese laboratory.

Amplicons obtained from 24 animals displayed sequences without any ambiguity and identical with exon 7 of the rat A1 sequence (AF264018). As for the remaining five animals (four Wistars, W02, W14, W26, W25, and one Sprague Dawley, SD1), amplicon sequences exhibited ambiguities, suggesting that they have most probably more than one *Abo* gene (or allele, for details see *Discussion*). We cloned amplicons obtained from four of these five animals (W02, W14, W26, and W25). Sequencing of 20 clones per amplicon demonstrated that each of these four animals has more than one A sequence in its genome (Table I). The remaining Sprague Dawley SD1 animal was found identical with W25 by direct sequencing and was not studied by cloning. Two A-like sequences were found in animals W02 (A1/A3) and three in animals W14 and W26 (A3/A4/A2) as well as in animal W25 (A1/A3/A4). The A2 sequence differs from the previously reported A2 sequence (AF469946) by only one position on exon 7 (574 C→T). This could correspond to either a typing error or a variant A2 allele.

A BLAST search using the rat A gene sequence AF264018 revealed the existence of expressed sequence tags (ESTs) corresponding to B-like sequences because the putative deduced protein presented a methionine and an alanine at positions orthologous to positions 266 and 268 of the human A or B enzymes. These are characteristic of a B transferase activity. To verify if the B-like gene is present in all rats, we designed two primers (Rat.Ex7.D and Rat.Ex7.R) to specifically amplify this sequence. These two primers were used to amplify B-like sequences from seven different animals, two from inbred rat lines (one Lewis and one BN) and five animals (four Wistar, W02, 14, 25, 26, and one Sprague Dawley, SD1) which have from two to three different A-like sequences in their genome. We obtained 430-bp amplicons from the seven animals and characterized these amplicons by direct sequencing. All sequences were identical and without any ambiguity. Further comparison of these sequences with the B-like rat cDNA obtained later showed that they are identical with the rat B-like cDNA (AB081652).

Characterization of the rat B gene

The complete rat cDNA sequence was obtained by CE, rapid amplification of cDNA ends (RACE)-polymerase chain reaction (PCR) amplification using primers deduced from the B-like 435-bp sequence amplified with the Rat.Ex7.D and rat.Ex7.R primers. It possesses an open reading frame of 1005 bp. Comparison of this sequence with that of known A or B gene sequences confirmed high similarity. It is identical to the recently published B rat sequence AB081652 in the coding region. Yet the two sequences show four nucleotide differences in the noncoding 5' and 3' regions. At the protein level, it showed 84% and 83% identity with the two previously reported rat A enzymes (AF264018, rat A1 and AF469946, rat A2) and 66% identity with the human B enzyme. As shown in Figure 1A, it presents a short intracytoplasmic domain, a transmembrane domain followed by a stem region, and catalytic domain, as all glycosyltransferases do. It shows a

Table 1. Comparison of the various rat A-type nucleotide sequences for exon 7

sequence	nucleotide position	Genbank
number		accession number
	1111 1111112222 2222223333 3333444445 5555	
	1123450112 3348992233 5678883447 8889022380 2447	
	0611926894 0347466748 6316798691 0294018175 0474	
A1	CGAGCCGCGC CTGTGCGCGA GCTCAGGCGC GACCTCCTGG CCGC	AF264018, AF469945
A2	TAG..T..AATA TC..C..... ..C..ATATA ..A.CTTCT. .TAT	AF469946, AB081650
A3	TAG..TAA..A .C.C.....G ..C..AT..A ..A.CTTCT. TTA.	AB081649
A4	TAGA..... .CC.TATAAG ATCTG.CA..A TG.A...CTT .T..	AB081651

Nucleotide sequences corresponding to exon 7 of the rat A gene were amplified using primers deduced from the A1 sequence as described in *Materials and methods*. Sequences were compared with the rat A1 sequence (AF264018), and only nucleotides at positions showing variation are shown. A dot at these positions indicates identity with the A1 sequence. Because only exon 7 was amplified, position 1 in the table corresponds to position 471 of the full-length coding sequence. The A1 sequence was the only one amplified from 24 animals out of 29, including 21 outbred rats. Of the remaining five outbred rats, one was A1/A3, two were A3/A4/A2, and two were A1/A3/A4.

deletion in the stem region when compared with the rat A enzymes. This deletion has been previously found in the mouse cis-AB enzyme (Yamamoto *et al.*, 2001). Divergences from the A enzymes sequences are spread throughout the protein, yet they are more numerous in the N-terminal part. Previous studies underscored the importance of the amino acid at position 268 with a glycine determining A activity versus an alanine determining B activity (Patenaude *et al.*, 2002; Yamamoto and McNeill, 1996). The new rat sequence presents an alanine at the orthologous position (position 249), suggesting a potential B enzyme activity.

Comparison of the nucleotide sequences of the rat A and putative B cDNAs with genomic sequences available in the rat genome data bank allowed complete determination of the genomic structure of both genes (Figure 1B). In both instances, all exon-intron boundaries conform to the GT-AG consensus rule. Unlike the human *ABO* gene and the rat A gene (Yamamoto *et al.*, 1995), the rat putative B gene coding sequence is comprised within six exons. It lacks the exon corresponding to the fourth exon of the A gene, which is replaced by an long terminal repeat (LTR) retroviral sequence, explaining the shortening of the stem domain. We previously mapped the A gene (symbol: *Abo*) to rat chromosome 3q11-q12. The new rat genomic data available confirm its localization on chromosome 3 in a region corresponding to q11-q12.

Unlike the A (*Abo*) gene, the putative rat B gene (symbol: *Abo2*) could not be localized unambiguously in the available rat genome sequence. We localized it using somatic cell hybrids. The *Abo2* gene was first assigned to rat chromosome 3, using a panel of 16 standard rat × mouse cell hybrid clones segregating rat chromosomes. No discordant

clone was obtained for chromosome 3, but at least two discordant clones were counted for each other chromosome (data not shown). The *Abo2* gene showed exactly the same distribution as the *Abo* gene. Chromosome placement by radiation hybrid mapping confirmed this result, with a precise localization close to the marker D3Rat54 (lod score = 8.39), like the *Abo* gene (Cailleau-Thomas *et al.*, 2002). The two genes are thus closely linked in the 3q11-q12 region.

Determination of the enzyme activity

A soluble form of the putative B enzyme was produced using the pSecTag vector and deleting the transmembrane domain. COS cells were transfected with the vector containing the truncated sequence, and their supernatant was assayed for the presence of B and A enzyme activities using radiolabeled UDP-Gal and UDP-GalNAc, respectively, as sugar donors and two different acceptors, namely, 2'fucosyllactose and H type 3-Sp-biotin. No recovery of either [¹⁴C]galactose or [¹⁴C]N-acetylgalactosamine above background was obtained in absence of acceptor substrate or with a supernatant from mock-transfected COS cells. After transfection with the truncated putative B cDNA, a transfer of galactose was obtained on both substrates with a clear preference for H type 3-Sp-biotin over 2'fucosyllactose. A small transfer of N-acetylgalactosamine was also observed on both substrates (Figure 2A). After transfection with the truncated A enzyme cDNA, a transfer of N-acetylgalactosamine was obtained for both substrates, also with a clear preference for H type 3-Sp-biotin over 2'fucosyllactose (data not shown). These results indicate that the truncated form of the new rat enzyme is a B histo-blood group enzyme with a small A transferase activity. To

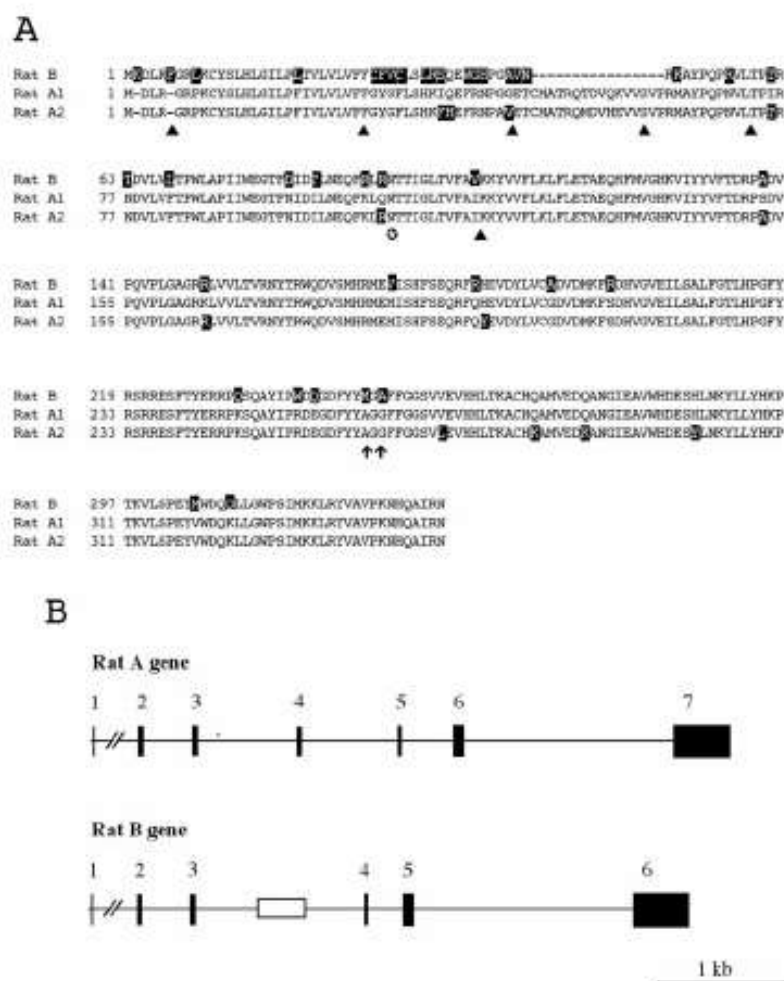


Fig. 1. Comparison of the amino acid sequences of the rat A and B transferases and genomic organization of the rat A and B genes. (A) Multiple alignment of the coding region of the B enzyme and of the A enzyme sequences AF264018 (A1) and AF469946 (A2). The predicted transmembrane domain is underscored. Amino acids of the B and A2 enzyme sequences that differ from the A1 enzyme sequence are boxed in black. Arrowheads represent the boundaries of exons. The arrows show the residues responsible for the A and B specificity of the human enzymes. The star denotes the conserved potential N-linked glycosylation site. (B) Organization of the rat A and B genes was obtained from analysis of rat genomic fragments (NW 043710, NW 043711, NW 043667). The coding A-type sequence corresponds to rat A1 (AF264018). Exons are boxed in black. The white box between exons 3 and 4 of the rat B gene corresponds to a retroviral LTR sequence. Introns between exons 1 and 2 of the A and B genes are 9282 bp and 10,249 bp long, respectively.

confirm that the *B* gene encodes a truly functional enzyme, the complete coding sequence was inserted into an eukaryotic expression vector and transiently transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing the H precursor. A clearly detectable subpopulation of cells expressed the B antigen after transfection with the putative B enzyme cDNA but not after transfection with the A enzyme cDNA. Inversely, a subpopulation of cells transfected with the A enzyme cDNA but not with the putative B enzyme cDNA, specifically expressed the A antigen (Figure 2B). The rat B

enzyme is therefore functional because it contributes to the synthesis of cell surface B histo-blood group epitopes.

Tissue expression of the B gene mRNA and of the A and B antigens

A reverse transcription (RT)-PCR analysis was performed to determine the tissue expression of the rat *B* gene. Primers were chosen to encompass several exons so as to exclude amplification of contaminating genomic DNA. To confirm

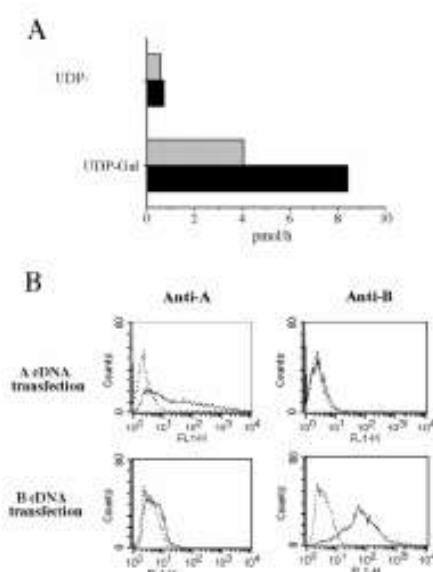


Fig. 2. Determination of the rat B enzyme catalytic activity. (A) Supernatants from COS cells transfected with the pSecTag B plasmid were used as a source of enzyme. Enzyme activities were determined using UDP-[14 C]Gal or UDP-[14 C]GalNAc as donor substrates and either 2-fucosyllactose (gray bars) or H type 3-Sp-biotin (black bars) as acceptor substrates. The products of the reactions were separated on either AG 1-X8 anion exchange columns or on Sep-Pak C18 cartridges according to the acceptor substrate. Background values were determined in absence of acceptor substrate and were deduced from those obtained in the presence of acceptors. Values of the enzyme activities are given in pmol/h of either [14 C]galactose or [14 C]N-acetylgalactosamine transferred. (B) CHO cells constitutively expressing H antigen after stable transfection with the rat FTB cDNA were transiently transfected with either the A or the putative B rat cDNAs. Forty-eight hours after transfection, cells were harvested and the A and B antigen expression was tested by flow cytometry using specific anti-A and anti-B mAbs.

specificity, the 786-bp fragment amplified from a stomach cDNA preparation was cloned and sequenced. As expected, the sequence was identical to that of the B gene. As illustrated in Figure 3 on a selected set of tissue preparations from BDIX rats, the cDNA was found at rather similar levels in all tissues examined including the stomach, small and large intestines, cecum, ovary, kidney, heart and striated muscle, submaxillary gland, liver, lung, skin, uterus, testis, lymph nodes, and brain. Notably, in some tissues (such as the heart), a minor band of smaller size was amplified. Although it has not been sequenced, this band could indicate expression of alternative splice variants. The same expression of mRNA was found in tissues from DA and WKY rats (data not shown).

We previously reported the tissue expression of the A and B antigens in BDIX rats (Cailleau-Thomas *et al.*, 2002). Because the A antigen expression in the gut is known to vary among different strains of rats, we looked for the distribution of A and B antigens in two other strains, DA and WKY. Similar to what we previously observed in BDIX, DA rats expressed the A antigen in the large intestine but not in the small intestine. At variance the A antigen

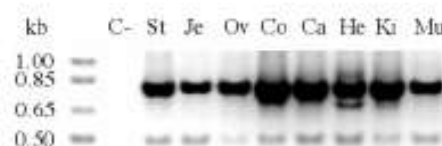


Fig. 3. Expression of the rat B gene. The expression of the rat B gene was assessed by RT-PCR with the 18S rRNA as internal control (488 bp). One microgram of total RNA was reverse transcribed and amplified with primers designed to amplify specifically a 786-bp fragment of the B enzyme cDNA and with primers and competitors for the 18S rRNA. PCR product were separated on a 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. C-, control in absence of cDNA; St, stomach; Je, jejunum; Ov, ovary; Co, colon; Ca, cecum; He, heart; Ki, kidney; Mu, muscle.

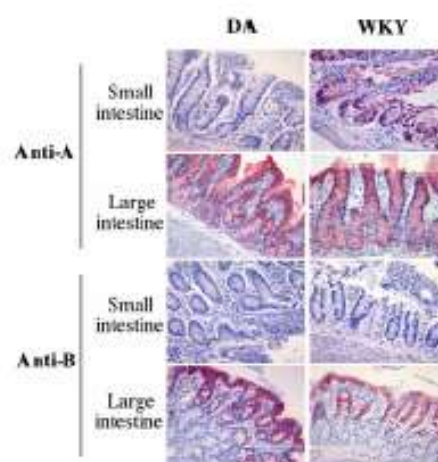


Fig. 4. Expression of the A and B antigens in the gut. Frozen tissue sections of the small and large intestine of DA and WKY rats were incubated with specific anti-A and anti-B mAbs. The binding was detected with an indirect peroxidase staining as described in *Materials and methods*. Both anti-A and anti-B give a positive staining of the large intestine of the two rat strains. In contrast, the A antigen is only detected in the small intestine of WKY rats, whereas the B antigen is not detected in the small intestine of either strain.

was present in both tissues of WKY rats. When detected, the A antigen was uniformly expressed throughout the mucosa. The B antigen expression was identical in the three strains of rats. It was present in the large intestine and the cecum but absent from the small intestine. In these tissues, B antigen expression was restricted to the surface epithelium (Figure 4). It was additionally found in the stomach, pancreas, and kidney. Yet it was never found in striated muscle, heart, liver, lung, skin, uterus, testis, lymph nodes, or brain. Therefore B antigen expression was restricted to a few tissues, although the B gene was expressed ubiquitously.

Discussion

It has been suggested that in the rat, the A and B histo-blood group antigens would not be synthesized by enzyme

products of alleles at the same locus (Bouhours *et al.*, 1995). Indeed, rats from inbred strains may express both A and B antigens, and the sequence of two rat cDNAs encoding active A specific enzymes have been reported (Olson *et al.*, 2002), suggesting that unlike mice, rats do not synthesize the A and B antigen using a single enzyme with dual specificity. The presence of B-type ESTs in databases reinforced the hypothesis of two independent loci in rat, one with two alleles encoding the A-type enzymes, the putative second gene encoding a B-type glycosyltransferase. Additionally, this hypothesis could explain why the distribution of the A and B antigens is not completely superimposable in rat tissues: A and B antigens would be synthesized by two different enzymes encoded by two independent loci with different patterns of tissue expression (Cailleau-Thomas *et al.*, 2002). This hypothesis, one *A* gene (*Abo*) and one *B* gene (*Abo2*), could also explain why rats of O type have never been observed, whereas rats not expressing A but expressing B antigen have been reported. Our specific aim was therefore to definitely prove the existence of the two *Abo*-type genes in rats and to characterize the gene encoding rat B enzyme.

From the ESTs available in databases, we were able to deduce primer pairs that allow specific amplification of either A-like or B-like sequences orthologous to exon 7 of the human *ABO* gene. These primer pairs were used on genomic DNA from either inbred or outbred rats. In animals from syngeneic lineages LEWIS and BN, two different amplicons were obtained; one was A-like, identical with the *A* gene sequence AF264018 (or rat A1), which we reported earlier, and one was B-like. In agreement with this observation, Olson *et al.* (2002) also reported that the rat A1 sequence was the only A-type sequence that they could amplify in these two strains of rats. In outbred animals (Wistar and Sprague Dawley), the rat A1 sequence was the only one that could be amplified in most animals. However we found that some animals have two or even three A-like sequences. These results are compatible with the presence of at least two A-type loci in rats being occupied by different alleles. The number of A-like genes would be variable in rats from chromosome to chromosome. The most common rat chromosome probably displays a single A locus occupied by the allele A1. This chromosome is so frequent that most rats are found homozygous A1/A1. In addition, the use of a B-like specific pair of primers led us to demonstrate the presence in their genome of a single B-like sequence identical with that found in LEWIS and BN rats.

Cloning the complete B-like open reading frame allowed us to determine that this gene codes for a functional B transferase. This study revealed four different A-like sequences (rat A1, A2, A3, and A4) in the group of animals tested indicating high variability of A-type sequences in the rat species. In contrast, no polymorphism of the *B* gene (*Abo2*) was found as judged from the partial sequence obtained from various animals. These results suggest that rats can present a variable number of *Abo* genes. All rats would have one *B* gene (*Abo2*). Inbred rats and the majority of outbred animals would have a single additional *Abo* gene encoding an A-type enzyme. In addition, some outbred animals would have two and possibly three genes encoding

A-type enzymes because it is not clear in the case of animals that show three A-type sequences if two of them can be alleles of the same gene.

The genomic organization of the *Abo2* gene is quite similar with that of the human *ABO* gene and the rat *Abo* gene (rat A1), except that it lacks exon 4 due to the insertion of a retroviral sequence. The mouse *Abo* gene, which encodes an enzyme with a dual cis-AB specificity, shared the same feature, suggesting that it could be orthologous to the rat *Abo2* gene rather than to the rat *Abo* gene (Cailleau-Thomas *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2001). The absence of exon 4 generates an enzyme with a shortened stem region. It is not clear if this affects the catalytic properties of the enzyme. However, it is interesting to note in this respect that the expression of the B antigen in rat tissues is much lower than that of the A antigen and similarly that a weak level of A and B antigens expression is also observed in the mouse (unpublished data). In humans, the A and B antigens are expressed at comparable levels as judged from the concentration of anti-A and anti-B monoclonal antibodies (mAbs) used to obtain a strong intensity of labeling. In rats, a comparable dilution of anti-A can be used to obtain a strong signal. Yet the anti-B must be used at least at a 50-fold higher concentration to obtain the same signal, indicating that the epitope density is much lower. In rats, like in humans, the presence of A antigen has been reported on both glycoproteins and glycolipids (Bouhours *et al.*, 1995; Breimer *et al.*, 1982; Hansson, 1983; Karlsson *et al.*, 1997; Laferte *et al.*, 1995; Ménoret *et al.*, 1995). In contrast, the B antigen has only been detected so far on glycolipids (Bouhours *et al.*, 1987; Breimer *et al.*, 1982; Hansson *et al.*, 1987). It is quite possible that the shortened stem region restricts accessibility of the catalytic domain to a smaller range of glycolipids and glycoprotein acceptors.

Expression of the B antigen is identical in the three strains of rats studied so far (BDIX, DA, WKY). It is restricted to some tissues, although the presence of the *Abo2* gene mRNA appears to be ubiquitous. This contrasts with the expression of the A antigen, which varies among different strains (Bouhours *et al.*, 1995; Breimer *et al.*, 1980) and is nearly coincident with the presence of the *Abo* gene mRNA (Cailleau-Thomas *et al.*, 2002; Iwamoto *et al.*, 2002). The lack of B antigen expression in some tissues may be due to the absence of H antigen expression because it is a compulsory acceptor for the B enzyme. Yet this is not the case in all tissues. For example, there is a strong expression of H antigen in the small intestine and although the *Abo2* gene mRNA is present, no B antigen can be detected, suggesting that the expression of the B antigen expression is regulated at a posttranscriptional level that has yet to be understood.

In total, we suggest that rats would possess a variable number of *Abo* genes—one gene encoding a B-type glycosyltransferase being present in all rats and the number of genes encoding an A-type glycosyltransferase being variable. Analysis of the rat genomic sequences revealed that the *Abo* and *Abo2* genes are located in the same region of chromosome 3 (3q11–q12), suggesting that they arose by duplication. As is well known, the duplication of a locus gives rise to a cycle of expansion and contraction of the locus (Miller *et al.*, 2002; Nei *et al.*, 1997). Indeed, by asymmetric

crossing over favored by homologous recombination, it is very easy to obtain haplotypes with various numbers of homologous genes. This would explain why the rat A-like sequences diverge much more than expected for alleles of a single gene. It is therefore quite possible that rat *Abo* haplotypes can have a variable number of *Abo* genes. It was reported that some rat lineages are completely A negative (Bouhours *et al.*, 1995). In such lineages, because of an asymmetric crossing over, the complete *Abo* locus would encompass only the B-encoding gene (*Abo2*). Unfortunately, DNA samples of such rat lineages were not available to test this hypothesis.

The presence of at least two *Abo* loci in the rat genome with one locus differentiated in coding a B type enzyme and at least another locus differentiated in coding an A type enzyme is intriguing. Indeed, the differentiation of the two types of transferases is mainly based on two codons (codons 266 and 268 of human ABO transferases). It is well known that after duplication the two genes show a tendency to homogenization through interlocus exchanges. Therefore, the maintenance of distinct A-type and B-type *Abo* genes in the rat genome suggests that there is some selective advantage for this species to maintain both types of genes. The second tendency of duplicated genes is that one of the two genes evolves to a pseudogene because of functional redundancy. To prevent this functional invalidation, one of the duplicated gene has to mutate and specialize to a function different from that of the ancestral gene. In the case of rat *Abo*, one can hypothesize that the ancestral gene was of A-type because all rat A sequences reported so far possess all exons compared with human and other primates, contrary to the rat B gene (*Abo2*), which lacks exon 4. The latter would have derived from the ancestral gene by deletion of exon 4 and mutation of the two codons defining specificity of the enzyme. As a matter of fact, comparing primate B-type sequences with the rat B-type sequence, one can observe that in primates codons 266 and 268 differ between the two types of alleles by only one base. Yet in rats these two codons differ by two bases. This in agreement with the hypothesis of an independent appearance of A-type and B-type *ABO* genes in rat and humans and reinforces the notion that *ABO* gene evolution is characterized by convergent evolution with the recurrent and independent appearance of A and B mutations in various mammalian species. It remains to be discovered what type of selective pressure leads to maintenance in rat of two differentiated *Abo* genes, whereas humans, as other primates, evolved to maintain an allelism at the *ABO* locus. The restricted tissue expression of the B antigen and the apparent lack of polymorphism of the *Abo2* gene suggest that in rats the B molecule might not be involved in host-pathogen interactions. Instead, it might have cellular functions. In this respect, it is interesting to note that unlike the A antigen, it is expressed by rat primary sensory neurons at the time of synaptogenesis, pointing toward a potential role in this fundamental cellular process (Astic *et al.*, 1989; Mollicone *et al.*, 1985).

A recent study, published while this article was in preparation, reported the existence of four different *Abo* gene sequences in a single outbred animal (Iwamoto *et al.*, 2002). These sequences correspond to rat A1, A3, A2, and B

sequences reported here, confirming that there should exist at least two A-type genes and one B-type gene in some rats. The complete rat genome project could be helpful in resolving the question of the number of rat *Abo* genes and alleles and of the evolution of the ABO system.

Materials and methods

Animals

Rattus norvegicus rats were obtained from Iffa Credo (France). They were from either syngeneic lines (BN, Lewis, BDIX, DA, and WKY) or outbred (Sprague Dawley and Wistar). Genomic DNA was extracted either from blood or tissue by classical methods.

PCR amplification of genomic DNA

Amplification of exon 7 of the rat *Abo* gene was performed by using the AB10 (ATCTGATGTGCCACAGGT) and 3'enzA (ACCATCCCGGGCCTTGATGGA) primers.

Briefly, PCR experiments were carried out in a final volume of 50 μ l. Between 150–200 ng of genomic DNA were used, with primers AB10 and 3'enzA at 0.5 μ M in 1 $\times$ solution Q Qiagen (Courtaboeuf, France), to which we added 25 μ l Taq Master Mix Qiagen (2.5 U Taq DNA polymerase + 200 μ M each of dNTP + 1 $\times$ Qiagen PCR buffer). The temperature cycles were as follows: denaturation 2' at 94°C, then 35 cycles (15" at 94°C, 30" at 55°C, 45" at 72°C) and elongation 7' at 72°C.

A BLAST search using the sequence of the rat A gene that we recently cloned (AF264018) revealed three rat ESTs with features of a B-like gene (GenBank accession numbers BF284956, BF544312, and BF544313). The following primers, Rat.Ex7.D CACGAGGGTCATCAGCCAC (forward) and Rat.Ex7.R GTAGCTGCTGGTCCACATG (reverse), deduced from these sequences, were used to amplify a 425-bp fragment of genomic DNA. PCR conditions used with these primers were identical with those described for primers AB10 and 3'enzA. Amplicons were size purified by electrophoresis and eluted from agarose gel with a gel extraction kit (Qiagen). The purified amplicons were sequenced using the Dye Terminator kit of Perkin Elmer (Boston, MA) and the amplification primers.

Cloning of a rat B-like cDNA

The Rat.Ex7.D and Rat.Ex7.R primers were used to amplify a cDNA fragment from a rat testis cDNA library (Clontech, Palo Alto, CA). The complete coding sequence was obtained from the testis cDNA library by RACE-PCR with primers deduced from the sequence of this fragment and the Clontech Marathon cDNA amplification kit. Elongation in the 5' direction was performed using the inverted primer CCACTGACCCCCCAAAGAAGGCTCCAT and the adaptor AP1 primer provided by the supplier. The second nested PCR was performed with the nested inverted primer GGCTCCCATATAGTAAAGT-CACCCITG and the nested adaptor primer AP2 from the supplier. The PCR was run with the Advantage Polymerase (Clontech) and the manufacturer's touchdown-RACE

program. Products were ligated in the pCR3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced. Because the longest fragment of 728 bp obtained did not contain the start codon, a second 5' RACE-PCR was performed using new inverted primers deduced from this fragment (TTCCTATTCACAGCTCCTGGGTGCCCCC and nested CCTGGGTGCCCCATTCTGGCTTCTGA). A 3' RACE-PCR was performed using the first primer CCAGGGTGACTTTTACTATATGGGAGCC and the AP1 primer, followed by a nested PCR with the nested primer ACTATATGGGAGCCCTTCTTGGGGGG and AP2. After ligation in the pCR3.1 vector, products were sequenced.

To prepare a truncated form of the enzyme lacking N-terminal putative cytosolic and transmembrane regions, PCR amplification with the primers AGGAAGGCC-TATCCCCAGCCAAGG (forward) and GAGTGCCCTGGCTATGGCCTGT (reverse) was performed using the testis cDNA as template. The 906-bp amplified fragment was inserted through EcoRV into the pSecTag2b vector (Invitrogen) and sequenced for verification. The resulting plasmid, named pSecTag B, will encode a fusion protein containing a secretion signal from the V-J2-C region of the mouse Ig kappa chain and the entire coding region for the putative catalytic domain of the rat B enzyme. A similar plasmid with the truncated A enzyme cDNA was prepared by inserting an EcoRI fragment of the rat A enzyme cDNA previously cloned in a pUC18 vector (Cailleau-Thomas *et al.*, 2002) into the pBlueScript KS+ vector. The truncated A enzyme sequence was then sub-cloned into pSecTag2b through KpnI insertion. After sequencing of the insert for verification, the resulting plasmid was named pSecTag A.

Sequence analysis

Multiple alignments were performed with the Clustal W program. Approximate location of transmembrane regions were determined using the TMHMM, tmap, and TopPred2 programs. Determination of the genomic organization of the *A* (*Abo*) and *B* (*Abo2*) genes was performed by analysis of the rat genomic sequences available in the NCBI database. The programs used are all available online at www.infobiogen.fr.

Chromosome localization

The *Abo2* gene was first assigned to a rat chromosome using a panel of standard rat $\times$ mouse cell hybrids that segregate rat chromosomes (Szpirer *et al.*, 1984). The hybrids were typed by PCR with the following primers: 5'-AGTGTGGAAGGCTGTGGG-3' (forward) and 5'-CTAAGATCCCTCCAACCAAT-3' (reverse). Both primers hybridize to sequences located in the intron between exons 5 and 6 of the *B* gene (*Abo2*), and their sequence does not show homology with that of the *A* gene or *Abo* (see Figure 1B). For regional localization, the panel of rat $\times$ hamster radiation cell hybrids (Watanabe *et al.*, 1999) was typed in the same manner. The mapping results were obtained from the rat radiation hybrid map server at the Otsuka GEN Research Institute (<http://ratmap.ims.u-tokyo.ac.jp/menu/RH.html>) (Watanabe *et al.*, 1999).

RT-PCR analysis

Total RNAs (1 μ g) from various rat tissues listed in Table I were prepared using the SV Total RNA isolation System kit from Promega (Madison, WI) and reverse transcribed at 42°C with the M-MLV reverse transcriptase (Promega). Contaminating DNA had been removed by digestion with RNase-free DNase I (10 U/ μ g RNA) for 15 min at room temperature. Amplification of the cDNA corresponding to the B enzyme cDNA was performed by nested PCR. The first amplification was performed using the following primers: GTATCCTTCGGGCGTTGAACCTCG (forward) and GAGTGCCCTGGCTATGGCCTGT (reverse) with initial denaturation at 94°C 3 min, followed by 20 cycles of 94°C 30 s, 65°C 30 s, and 72°C 2 min. The second amplification was performed with the nested primers AGGAAGGCCTATCCCCAGCCAAGG (forward) and GTAGCTGCTGGTCCACATG (reverse) together with the primers and competitors from the QuantumRNA 18S kit (Ambion, Austin, TX) to coamplify the 18S rRNA as an internal control. The following program was used: initial denaturation at 94°C 1 min, followed by 30 cycles of 94°C, 30 s; 60°C, 30 s; and 72°C, 90 s. The amplification yields two products of 786 bp for the *B* gene and 488 bp for the 18S rRNA.

Detection of enzyme activity

COS cells were transfected with either the pSecTag A or the pSecTag B vectors using lipofectamine (Gibco BRL). After 48 h, the supernatant was collected and used as a crude enzyme preparation. The reaction mixtures contained 50 μ l COS supernatant, 30 mM MnCl₂, 5 mM ATP, 10 mM NaN₃, either 5 mM 2'fucosylactose (Fuc α 2Gal β 4Glc) or 0.56 mM Fuc α 2Gal β 3GalNAc α -sp-biotin (Syntesome, Munich, Germany) as sugar acceptors and either 20 μ M UDP-D-[¹⁴C]-N-acetylgalactosamine (55 mCi/mmol, ICN, Costa Mesa, CA) or 20 μ M UDP-D-[¹⁴C]-galactose (278 mCi/mmol, NEN Chemical Center, Dreieichendain, Germany) as sugar donors in a final volume of 50 μ l and incubated at 37°C for 16 h. After incubation, the reaction mixture was quenched with 750 μ l distilled water and applied to an AG1-X8 column, chloride form, 100–200 mesh (Bio-Rad, Hercules, CA) when 2'fucosylactose was the acceptor or to a Sep-Pak C18 cartridge (Waters-Millipore, Bedford, MA) when Fuc α 2Gal β 3GalNAc α -sp-biotin was used. The radiolabeled products were then eluted with 1 ml water in the case of AG1-X8 columns or with 5 ml methanol in the case of Sep-Pak C18 cartridge and counted in 10 ml scintillation liquid (Ready Safe, Beckman, Palo Alto, CA). Background levels of radioactivity were obtained from controls without exogenous acceptor and from supernatants from mock-transfected COS cells. Values obtained for the controls were then subtracted from those obtained for the assays.

CHO cells stably transfected with the rat FTB (α 1,2fucosyltransferase) cDNA were prepared as previously described (Cailleau-Thomas *et al.*, 2002). These cells strongly express H antigenic determinants that can be used as acceptors for the A and B enzymes. They were transiently transfected with pCR3.1 plasmids containing the complete rat A or putative rat B cDNA using lipofectAMIN (Gibco BRL,

Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Forty-eight hours after transfection, cell surface expression of A and B epitopes was assayed by flow cytometry. For this aim, cells (2×10^5 cells/well) were incubated with the anti-A mAb 3-3A at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1% gelatin for 1 h at 4°C or with the anti-B mAb ED3 as a cell supernatant at a one-half dilution. The anti-A mAb 3-3A was obtained from Dr. J. Bara (Villejuif, France). It recognizes all types of A antigens (Bara *et al.*, 1988) and does not show any detectable cross reactivity with B epitopes as judged from enzyme immunoassay with synthetic oligosaccharides and immunostaining of human tissues of known ABO phenotypes. The anti-B mAb ED3 is a gift from Dr. A. Martin (Rennes, France). It recognizes all types of B and shows no detectable cross-reactivity with A epitopes or with the Gal α 1,3Gal epitope (Le Pendu *et al.*, 1997). After washing in the same buffer, a second 45-min incubation was performed with an fluorescein isothiocyanate-labeled anti-mouse IgG (Sigma, St. Louis, MO). Following three washes, propidium iodide was added, and fluorescence analysis was performed on a FACScan (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) using the CELLQUEST program. Dead cells, propidium iodide positive, were excluded from the analysis.

Immunohistochemical analysis

Tissues from 2–3-month-old rats were collected and paraffin embedded after fixation in ethanol for 48 h. Sections (5 μm) were prepared and washed in PBS. Endogenous peroxidase was inhibited using methanol/ H_2O_2 0.3% for 20 min. Sections were then washed in PBS for 5 min and covered with PBS/bovine serum albumin (BSA) 1% for 20 min at room temperature in a moist chamber. After washing in PBS, sections were covered with either of the primary antibodies diluted in PBS/BSA 1% and left at 4°C overnight. The anti-A mAb 3-3A was used as an ascitic fluid diluted 1/10⁵ and the anti-B mAb ED3 was used as a cell supernatant diluted one-half. Sections were then rinsed three times with PBS and incubated with biotinylated anti-mouse IgG (Vector Labs, Burlingame, CA) diluted at 1/100 for 60 min at room temperature. After washing in PBS, the sections were covered with peroxidase-conjugated avidin (Vector Labs) diluted at 1/1000 for 45 min and washed with PBS; reactions were revealed with 3-amino-9-ethylkarbazol. Counterstaining was performed with Mayer's hemalun.

Acknowledgments

The authors are grateful to Drs. J. Bara and A. Martin for their generous gift of antibodies and to S. Minault for great animal care. They thank Pascale Van Vooren for excellent technical assistance. The work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Etablissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée, the French Ministry of Research (grant E.A. 3034) and by a grant from the Association for International Cancer Research (AICR). C.S. is a research director of the National Fund for Scientific Research (FNRS, Belgium).

Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; CHO, Chinese hamster ovary; EST, expressed sequence tag; LTR, long terminal repeat; mAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; RACE, rapid amplification of cDNA ends; RT, reverse transcription.

References

- Asic, L., Le Pendu, J., Mollicone, R., Saucher, D., and Oriol, R. (1989) Cellular expression of H and B antigens in the rat olfactory system during development. *J. Comp. Neurol.*, **289**, 386–394.
- Bara, J., Gautier, R., Le Pendu, J., and Oriol, R. (1988) Immunochemical characterization of mucins. Polypeptide (M1) and polysaccharide (A and Le^b) antigens. *Biochem. J.*, **254**, 185–193.
- Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T., and O'Donnell, S. (1987) Association between O blood group and occurrence and severity of diarrhoea due *Escherichia coli*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**, 120–123.
- Blancher, A. and Socha, W.W. (1997) ABO, Hh and Lewis blood groups in humans and nonhuman primates. In Blancher, A., Klein, J., and Socha, W.W. (Eds.), *Molecular biology and evolution of blood group and MHC antigens in primates*. Springer-Verlag: Berlin, pp. 30–92.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K.A., Larson, G., and Normak, S. (1993) Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*, **262**, 1892–1895.
- Bouhours, D., Hansson, G.C., and Bouhours, J.F. (1995) Structure and genetic polymorphism of blood group A-active glycosphingolipids of the rat large intestine. *Biochem. Biophys. Acta*, **1255**, 131–140.
- Bouhours, J.F., Bouhours, D., and Hansson, G.C. (1987) Developmental changes of gangliosides of the rat stomach. Appearance of a blood group B-active ganglioside. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16370–16375.
- Breimer, M.E., Hansson, G.C., Karlsson, K.A., and Leffler, H. (1980) Human blood group A-positive and -negative strains of rats. Chemical basis as shown by fucolipids of small intestine. *FEBS Lett.*, **114**, 51–56.
- Breimer, M.E., Hansson, G.C., Karlsson, K.A., and Leffler, H. (1982) Glycosphingolipids of rat tissues. Different composition of epithelial and non-epithelial cells of small intestine. *J. Biol. Chem.*, **257**, 557–568.
- Caillaud-Thomas, A., Le Moullat-Vaichye, B., Rocher, J., Bouhours, D., Szpirer, C. and Le Pendu, J. (2002) Cloning of a rat gene encoding the histo-blood group A enzyme. Tissue expression of the gene and of the A and B antigens. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4040–4047.
- Clausen, H. and Hakomori, S.I. (1989) ABO and related histo-blood group antigens; immunological differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang.*, **56**, 1–20.
- Doxiadis, G.G.M., Otting, N., Antunes, S.G.M., de Groot, N.G., Harvey, M., Doxiadis, L.N., Jonker, M., and Bontrop, R.E. (1998) Characterization of the ABO blood group genes in macaques: evidence for convergent evolution. *Tissue Antigens*, **51**, 321–326.
- Geisel, J., Steuer, M.K., Ko, H.L., and Beuth, J. (1995) The role of ABO blood groups in infections induced by *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Zentralbl. Bakteriol.*, **282**, 427–430.
- Glass, R.I., Holmgren, J., Haley, C.E., Khan, M.R., Svennerholm, A.M., Stoll, B.J., Belyet Hossain, K.M., Black, R.E., Yunus, M., and Barua, D. (1985) Predisposition for cholera of individuals with O blood group. Possible evolutionary significance. *Am. J. Epidemiol.*, **121**, QJ:791–796.
- Hansson, G.C. (1983) The structure of two blood group A-active glycosphingolipids with 12 sugars and a branched chain present in the epithelial cells of rat small intestine. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9612–9615.
- Hansson, G.C., Bouhours, J.F., and Angström, J. (1987) Characterization of neutral blood group B-active glycosphingolipids of rat gastric mucosa. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13135–13141.
- Heissigerova, H., Breton, C., Moravcova, J., and Imberty, A. (2003) Molecular modeling of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of blood group A, blood group B, Forssman and iGb3 antigens and their interaction with substrates. *Glycobiology*, **13**, 377–386.
- Iwamoto, S., Kumada, M., Kamesaki, T., Okuda, H., Kajii, E., Inagaki, T., Saikawa, D., Takeuchi, K., Ohkawara, S., Takahashi, R.,

- and others. (2002) Rat encodes the paralogous gene equivalent of the human histo-blood group ABO gene. *J. Biol. Chem.*, **277**, 46463–46469.
- Karlsson, N.G., Herrmann, A., Karlsson, H., Johansson, M.E., Carlstedt, L., and Hansson, G.C. (1997) The glycosylation of rat intestinal Muc2 mucin varies between rat strains and the small and large intestine. A study of O-linked oligosaccharides by a mass spectrometry approach. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27025–27034.
- Kermarrec, N., Roubinet, F., Apoil, P.A., and Blancher, A. (1999) Comparison of allele O sequences of the human and nonhuman primate ABO system. *Immunogenetics*, **49**, 517–526.
- Kominato, Y., McNeill, P.D., Yamamoto, M., Russell, M., Hakomori, S.I., and Yamamoto, F. (1992) Animal histo-blood group ABO genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 154–164.
- Laferte, S., Prokopenko, N.L., Moyana, T., and Bird, R.P. (1995) Monoclonal antibody recognizing a determinant on type 2 chain blood group A and B oligosaccharides detects oncodevelopmental changes in azoxymethane-induced rat colon tumors and human colon cancer cell lines. *J. Cell. Biochem.*, **57**, 101–119.
- Le Pendu, J., Le Cabellec, M., and Bara, J. (1997) Immunohistological analysis of antibodies against ABH and other glycoconjugates in normal human pyloric and duodenal mucosae. *Transfus. Clin. Biol.*, **1**, 41–46.
- Lindstedt, R., Larson, G., Falk, P., Jodal, U., Leffler, H., and Swanborg, C. (1991) The receptor repertoire defines the host range for attaching *Escherichia coli* strains that recognize globo-A. *Infect. Immun.*, **59**, 1086–1092.
- Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoën-Clouet, N., Clément, M., and Le Pendu, J. (2001) ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie*, **83**, 565–573.
- Martínko, J.L., Vincek, V., Klein, D., and Klein, J. (1993) Primate ABO glycosyltransferases: evidence for trans-species evolution. *Immunogenetics*, **37**, 274–278.
- Ménoret, A., Otry, C., Labarrière, N., Brémer, M.E., Piller, F., Meffah, K., and Le Pendu, J. (1995) The expression of carbohydrate blood group antigens correlates with heat resistance. *J. Cell Sci.*, **108**, 1691–1701.
- Miller, K.M., Kaukinen, K.H., and Schulze, A.D. (2002) Expansion and contraction of major histocompatibility complex genes: a teleostean example. *Immunogenetics*, **53**, 941–963.
- Mollicone, R., Trojan, J., and Oriol, R. (1985) Appearance of H and B antigens in primary sensory cells of the rat olfactory apparatus and inner ear. *Brain Res.*, **349**, 275–279.
- Nei, M., Gu, X., and Sitnikova, T. (1997) Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 7799–7806.
- Olson, F.J., Johansson, M.E.V., Klinga-Levan, K., Bouhours, D., Enerbäck, L., Hansson, G.C., and Karlsson, N.G. (2002) Blood group A glycosyltransferase occurring as alleles with high sequence difference is transiently induced during a *Nippostrongylus brasiliensis* parasite infection. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15044–15052.
- Olsson, M.L. and Chester, M.A. (2001) Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfus. Med.*, **11**, 295–313.
- Oriol, R., Mollicone, R., Coullin, P., Dalix, A.M., and Candelier, J.J. (1992) Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS*, **100**(Suppl 27), 28–38.
- Patenaude, S.I., Seto, N.O.L., Borisova, S.N., Szpacenko, A., Marcus, S.L., Pakic, M.M., and Evans, S.V. (2002) The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nature Struct. Biol.*, **9**, 685–690.
- Roubinet, F., Kermarrec, N., Despiau, S., Apoil, P.-A., Dugoujon, J.M., and Blancher, A. (2001) Molecular polymorphism of O alleles in five populations of different ethnic origins. *Immunogenetics*, **53**, 95–104.
- Steuer, M.K., Beuth, J., Hofstadter, F., Probst, L., Ko, H.L., Pulverer, G., and Strutz, J. (1995) Blood group phenotype determines lectin-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human outer ear canal epithelium. *Zentralbl. Bakteri.*, **282**, 287–295.
- Swerdlow, D.L., Mintz, E.D., Rodriguez, M., Tejada, E., Ocampo, C., Espejo, L., Barrett, T.J., Petzelt, J., Bean, N.H., and Seminario, L. (1994) Severe life-threatening cholera associated with blood group O in Peru: implications for the latin american epidemic. *J. Infect. Dis.*, **170**, 468–472.
- Sziper, J., Levan, G., Thörn, M., and Sziper, C. (1984) Gene mapping in the rat by mouse-rat cell hybridization: synteny of the albumin and alpha-fetoprotein genes and assignment to chromosome 14. *Cytogenet. Cell Genet.*, **38**, 142–149.
- Taylor, S.G., McKenzie, I.F., and Sandrin, M.S. (2003) Characterization of the rat $\alpha(1,3)$ galactosyltransferase: evidence for two independent genes encoding glycosyltransferases that synthesize Gal $\alpha(1,3)$ Gal by two separate glycosylation pathways. *Glycobiology*, **13**, 327–337.
- Watanabe, T.K., Bihorau, M.T., McCarthy, L.C., Kiguwa, S.I., Hishigaki, H., Tsuji, A., Browne, J., Yamasaki, Y., Mizoguchi-Miyakita, A., Oga, K., and others. (1999) A radiation hybrid map of the rat genome containing 5,255 markers. *Nature Genet.*, **22**, 27–36.
- Watkins, W.M. (1999) A half century of blood-group antigen research. Some personal recollections. *Trends Glycosci. Glycotech.*, **11**, 391–411.
- Yamamoto, F. (2000) Molecular genetics of ABO. *Vox. Sang.*, **78**, 91–103.
- Yamamoto, F. and McNeill, P.D. (1996) Amino acid residue at codon 268 determines both activity and nucleotide-sugar donor substrate specificity of human histo-blood group A and B transferases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10515–10520.
- Yamamoto, F., McNeill, P.D., and Hakomori, S.I. (1995) Genomic organization of the human histo-blood group ABO genes. *Glycobiology*, **5**, 51–58.
- Yamamoto, M., Lin, X.-H., Kominato, Y., Hata, Y., Noda, R., Saitou, N., and Yamamoto, F. (2001) Murine equivalent of the human histo-blood group ABO gene is a cis-AB gene that encodes a glycosyltransferase with both A and B transferase activity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 13701–13708.

Article 2 : Evolution à long terme des gènes de la famille ABO des poissons aux mammifères: un modèle évolutif de « naissance et mort ».

La famille 6 des glycosyltransférases (GT6) se compose de quatre membres connus : les glycosyltransférases A et B du groupe sanguin (Abo), l' α 1,3-galactosyltransférase (Ggta1) responsable de la synthèse du xénoantigène, la Forssman synthase (FS) et l'iGb3 synthase (iGb3s). Toutes ces enzymes partagent des motifs caractéristiques nommés LBR (site de liaison au ligand) identifiés par Heissigerová et ses collaborateurs (Heissigerova et al., 2003). Nous nous sommes intéressés à l'identification de nouveaux membres de la famille.

Un alignement BLAST est réalisé avec la séquence Ggta1 sur le génome de rat. Cela nous permet d'identifier trois nouveaux membres de la famille nommés GT6m5, GT6m6, GT6m7. Après obtention et clonage des séquences complètes, nous avons cherché à identifier leurs fonctions enzymatiques, sans succès.

Le gène *GT6m5* est constitué de 5 exons codants et code pour une protéine transmembranaire de type II, qui présente 49% d'homologie avec Ggta1. L'analyse de sa séquence protéique montre qu'il ne possède ni les cystéines conservées décrites par Shetterly (Shetterly et al., 2001), ni le motif DVD, ni les motifs LBR.

Le gène *GT6m6* est quant à lui réparti sur 5 exons codants et code pour une protéine transmembranaire de type II, qui présente 57% d'homologie avec Ggta1. Contrairement à GT6m5, il possède le motif DVD, les cystéines caractéristiques et les motifs LBR.

Le gène *GT6m7* est réparti sur 6 exons et code pour une protéine de type II aux caractéristiques protéiques similaires à GT6m5.

Une localisation chromosomique a montré que *GT6m5* et *GT6m6* sont situés sur le chromosome 3p11 de rat, proche de Ggta1. Le gène *GT6m7* est quant à lui localisé sur le chromosome 3p13, proche des gènes *Abo* et *FS*. Ce chromosome est orthologue du chromosome humain 9q34, qui porte les gènes de la famille GT6. Chez l'Homme, seul le gène *GT6m7* est identifié, mais il présente un codon STOP précoce.

L'identification de ces nouveaux gènes nous a amené à réaliser une analyse phylogénétique de la famille GT6, qui suivrait le modèle évolutif de naissance et mort décrit par Nei et Rooney (Nei and Rooney, 2005). La famille GT6 peut être divisée en deux sous groupes principaux : Abo et FS d'une part, et Ggta1, iGb3S, GT6m5, GT6m6 et GT6m7

d'autre part. Chez les poissons, un troisième sous-groupe, GT6m8 qui ne semble pas avoir d'orthologues chez les autres vertébrés est mis en évidence.

L'étude des nouveaux membres de la famille GT6 ne nous a pas permis d'identifier leur fonction enzymatique, si elle existe. L'étude de l'évolution de la famille à travers différentes espèces (du poisson à l'Homme) nous permet d'établir son modèle évolutif selon le principe de « naissance et mort ». L'évolution rapide de GT6m5, GT6m6 et GT6m7, en comparaison avec les autres membres de la famille laisse supposer qu'ils ont subi une moindre pression de sélection purifiante et qu'ils auraient perdu leur activité enzymatique.

LONG TERM EVOLUTION OF THE GLYCOSYLTRANSFERASE 6 (ABO) GENE FAMILY FROM FISHES TO MAMMALS: A BIRTH-AND-DEATH EVOLUTION MODEL

Key words : ABO/ birth-and-death/ evolution/ Glycosyltransferase/ histo-blood group

Anne-Laure Turcot-Dubois², Béatrice Le Moullac-Vaidye², Stéphanie Despiau³, Nicolai Bovin⁴, Jacques Le Pendu², Antoine Blancher^{1,3}

²INSERM U601, Université de Nantes, Institut de Biologie, 9 Quai Moncousu, 44093, Nantes Cedex, France.

³Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, Université Paul Sabatier, Hôpital Rangueil, 31403 Toulouse Cedex 4, France.

⁴Shemyakin Institute for Bioorganic Chemistry, 117871, Moscow, Russia.

¹To whom correspondance should be addressed ;
Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, Université Paul Sabatier, Hôpital Rangueil,
31403 Toulouse Cedex 4, France
Tel. 33 561 32 34 34
Fax 33 561 32 34 24
e-mail : blancher.a@chu-toulouse.fr

[Glycobiology](#). 2007 May;17(5):516-28. Epub 2007 Feb 13.
Erratum in: [Glycobiology](#). 2007 Aug;17(8):14G.

Long-term evolution of the CAZY glycosyltransferase 6 (ABO) gene family from fishes to mammals--a birth-and-death evolution model.

[Turcot-Dubois AL](#), [Le Moullac-Vaidye B](#), [Despiau S](#), [Roubinet F](#), [Bovin N](#), [Le Pendu J](#), [Blancher A](#).

ABSTRACT

Glycosyltransferase family 6 (GT6) identified members catalyse the transfer of α 1,3-linked galactose or N-acetylgalactosamine to give several antigens related to the histo-blood group family, the A and B antigens, the Forssman antigen, the α Gal xenoantigen and the iGb3 glycolipid. We have identified three new mammalian genes encoding putative proteins belonging to the GT6 family. Of the three proteins, only one, GT6m6, possesses all features characteristic of active enzymes of this family, while the other two, GT6m5 and GT6m7, display major alterations of GT6 motifs involved in divalent cation and substrate binding. The three new genes are present in the rat, mouse, dog, and cow genomes. Human and chimpanzee genomes lack GT6m5 and GT6m6. The GT6m7 human sequence presents a premature stop codon that is not observed in macaques. Based on protein sequence comparison, gene structure and syntenicity, GT6 homologous sequences were also identified in non mammalian, bird, fishes and amphibian, vertebrate genomes. Strikingly, the number and type of GT6 genes varied from species to species, even within phylogenetically related groups. Human, mouse, and cow have only one *ABO* gene, but rat and dog have several. With the exception of some alleles at the *ABO* locus, the other GT6 genes are either absent or lost from the human genome. Only one member of the family, *Forsman synthase-like*, was found in the chicken. Five *Forsman synthase-like* genes were found in zebrafish but absent from three other fishes (fugu, puffer fish and medaka). Two *iGb3 synthase-like* genes were found in the latter fish species that are absent from zebrafish. Fugu, puffer fish and medaka have an additional GT6 gene that we termed *GT6m8* which is absent from all other species analysed. These observations indicate that individual GT6 genes have expanded and contracted by repeated duplications and deletions during vertebrate evolution, in accordance with a model of birth-and-death evolution.

INTRODUCTION

Glycosyltransferases form a functional family of intracellular membrane bound enzymes. They participate coordinately in the biosynthesis of carbohydrate moieties of glycoproteins and glycolipids, which play an important role in various cellular functions (Varki, 1993). Glycosyltransferases have been classified into families, on the basis of sequence similarities, in the CAZY database (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GT.html>) and most often, within a given family, the various enzymes transfer the same sugar residue. Enzymes of the glycosyltransferase family 6 (GT6) contribute to the synthesis of histo-blood group-related antigens. These enzymes are type II transmembrane proteins localized in the Golgi, with a cytoplasmic tail, a transmembrane domain of about twenty amino acids, and a large luminal catalytic domain. All glycosyltransferases within the CAZY database GT6 family transfer either a galactose or an N-acetylgalactosamine in α 1,3 linkage from a UDP nucleotide sugar, retaining the α configuration of the transferred Gal or GalNAc (Hennet, 2002). Their activity requires the presence of the divalent cation, Mn^{2+} . It has been shown that a conserved DVD motif interacts with both the nucleotide-sugar and the divalent cation (Boix et al., 2001; Boix et al., 2002;; Gastinel et al., 2001; Patenaude et al., 2002). Conserved cysteines have additionally been identified within the GT6 family (Shetterly et al., 2001). Moreover, analysis of the crystal structure of the Ggtal enzyme and of the A and B histo-blood group enzymes together with molecular modelling allowed characterisation of conserved amino acids regions involved in the substrate binding sites. These regions were called LBR for ligand binding regions by Heissigerova et al. Additionally, the carboxylic terminal amino acids have to be acidic and seem to play a role in the enzyme function (Heissigerova et al., 2003).

Among the presently known enzymes in the family, the histo-blood group A and B enzymes transfer either a GalNAc or a Gal synthesizing the A or B histo-blood group antigens

respectively. In human, they are products of the *A* and *B* alleles at the *ABO* locus and both use as acceptor substrate the H histo-blood group antigen characterised by the presence of a fucose in C2 position of the Gal residue of the acceptor, which thus corresponds to the H histo-blood group antigen. The products of the various *O* alleles of the *ABO* gene are inactive leaving unchanged the H antigen, thus characteristic of the O blood group (Yamamoto, 2000). The α 1,3-galactosyltransferase enzyme or Ggta1, which is responsible for the synthesis of the α -Gal epitope found in most mammalian species with the exception of all apes and Old World monkeys, transfers a galactose on an N-acetyllactosamine unit (Galili, 2001). The Forssman synthase (FS) transfers a GalNAc on a glycolipid, the globotetraosylceramide (Haslam and Baenziger, 1996). From species to species, the Forssman gene seems to be active or inactive. Thus, mouse is Forssman positive while rat is Forssman negative, chicken is Forssman positive but pigeon is Forssman negative. The last functional member of the GT6 family, the isogloboside 3 synthase (iGb3S) transfers a galactose on lactosylceramide. This gene is a pseudogene in human but is active in several other mammals (Keusch et al., 2000).

Searching for new GT6 family members by blast in human, rat and mouse genomes, we identified three putative genes encoding proteins displaying significant homology with GT6 functionally identified enzymes and observed that in the human, rat and mouse genomes, the corresponding genes were either present or absent. We thus sought to explore the variation in GT6 gene members in various vertebrate species for which significant genome sequence data are available in databanks. For this aim, we searched databanks for genomic GT6 segments and putative GT6 enzyme sequences. Although it has not been possible to define the enzyme activity of all proteins displaying significant homology with GT6 functional members, the analysis allows us to propose a scheme of long term evolution for this glycosyltransferase gene family.

RESULTS

New mammalian GT6 family members

A blast search in the rat genome with the mouse *Ggtal* cDNA sequence as a query revealed the existence of putative genes displaying homology with the GT6 family. They were termed *GT6m5*, *GT6m6* and *GT6m7* for glycosyltransferase family 6 member 5, 6 and 7, respectively since four members of the family were already known (*ABO*, *FS*, *Ggtal* and *iGb3S*). The complete rat cDNA sequences of *GT6m5* and *GT6m6* were obtained by reverse transcription and RACE-PCR. Transcripts for *GT6m5* and *GT6m6* were detected in small amounts in some rat tissues: olfactory bulb, lung, kidney and salivary glands. The highest expression was found in the olfactory bulb (see additional material, Tables 2 and 3). The human and macaque *GT6m7* cDNAs were also cloned.

The coding sequences of both *GT6m5* and *GT6m6* are comprised within 5 exons, whereas that of *GT6m7* is comprised within 6 exons. One and two additional transcribed non coding exons were identified upstream of the start codon for *GT6m5* and *GT6m6*, respectively. Three *GT6m5* mRNA isoforms were characterised during the amplification of the complete coding sequence: a long 966 bp isoform and two shorter isoforms of 828 bp and 744 bp which result from alternative splicing since they lack either exon 4 only or exons 2, 3 and 4, respectively. The reading frame is conserved in the splice variants. Sequence comparison with known members of the GT6 family indicate that exon 4 encodes part of the catalytic domain. The short putative *GT6m5* isoforms are thus expected to lack enzyme activity. At the protein level, rat *GT6m5*, *GT6m6* and *GT6m7* show 49%, 57% and 51% identity with rat *Ggtal*, respectively. Their general structure correspond to that of most glycosyltransferases with a short N-terminal cytoplasmic domain, a transmembrane domain followed by a stem region and a catalytic domain. However, comparison with other members of the GT6 family reveals significant characteristics. Neither the DxD motif, which interacts with the divalent cation and

is conserved in almost all glycosyltransferases, nor the typical cysteine residues of the GT6 family, identified by Shetterly et al. (Shetterly et al., 2001), are present in GT6m5 and GT6m7. Yet, they are present in GT6m6. Likewise, the ligand binding regions (LBR) characterised by Heissigerova et al (Heissigerova et al., 2003). are either clearly altered or absent from both GT6m5 and GT6m7 putative proteins but not from GT6m6 (Fig. 1). Nine LBRs have been identified and named from A to I. All are quite well conserved in the GT6m6 putative protein, except for the arginine or lysine residue of LBR-A which is replaced by a serine in the rat sequence. The arginine or lysine of LBR-A makes contact with the uridine or ribose of the donor in the human A and B enzymes as well as in the bovine Ggtal. Notably, in other mammalian species, the arginine at this position of GT6m6 is conserved (Fig. 1). Likewise, LBR-A, as well as LBR-D and LBR-E, which interact with the Gal or GalNAc of the donor substrate or the oligosaccharide acceptor, are partly conserved in GT6m5 and GT6m7. In contrast, the LBR-B, LBR-C (the DxD motif), LBR-F, LBR-G LBR-H and LBR-I are completely absent from the GT6m5 and GT6m7 sequences. Amino acids of these motifs are crucial for interactions with the divalent cation, the nucleotide, the pyrophosphate or the sugar of the donor substrate.

Assay of the enzyme activities

The full coding sequence of rat *GT6m5* and *GT6m6* were cloned in a eukaryotic expression vector and transfected into CHO cells either expressing an α 1,2fucosyltransferase or not. Analysis of cell surface glycosylation using a set of lectins and monoclonal antibodies following transfection did not reveal any change. In contrast, control transfection with the A rat enzyme cDNA of α 1,2fucosyltransferase-expressing CHO cells led to A antigenic expression. Likewise, control transfection with the rat Ggtal cDNA allowed expression of GS1-B4 lectin binding sites (see additionnal material, Fig. 1). Soluble forms of the rat GT6m5

and GT6m6 enzymes lacking the intracytoplasmic and transmembrane domains were produced in COS cells using the pSecTag2 vector. The acceptor substrate specificity of both potential enzymes was tested on a series of oligosaccharides. Since the known enzymes of the GT6 family catalyse the transfer of either a galactose or an N-acetylgalactosamine, UDP-Gal and UDP-GalNAc were used as donor substrates. No enzyme activity could be detected in conditions where the soluble rat A enzyme prepared in the same manner showed clear activity (see additional material Table 1). Thus, we were unable to demonstrate any glycosyltransferase activity for these two new members of the GT6 family.

Chromosome localisation and structure of the GT6 genes

The three new genes are localised on rat chromosome 3 like most members of the gene family. The most telomeric member of the GT6 family is *GT6m7*, localised in 3p13 at 1.25 Mb and thirty loci apart from the rat *Abo* genes. Depending on the strain two or more *Abo* genes are present in rat genomes, representing paralogues located at the border between 3p13/3p12 (Iwamoto et al., 2002; Turcot et al., 2003). Further centromeric, 1.7 Mb and twenty five loci apart, lies a *FS* pseudogene in 3p12. In rat, this gene lacks all small 5' exons and retained the two last exons only, in line with the absence of Forssman glycolipid in that species. Much further centromeric, 6.9 Mb apart, in 3p11, lies *GT6m5* separated by only one locus (similar to spermidine synthase) from *GT6m6* and *Ggtal1* which are contiguous (Fig. 2). The *iGb3S* locus is on rat chromosome 5. In addition, two fragments of probable processed *Abo* pseudogenes are found at 1q21 and 15q11 in the rat genome. A comparison with the human genome revealed a general similar organisation of the GT6 genes. The human genome region orthologous to rat chromosome 3p11-3p13 is chromosome 9q34. The most telomeric GT6 family member on this chromosome is *GT6m7* like in the rat genome, then come the *ABO* and *FS* loci and further centromeric the *GGTAL1* locus. However, the *GT6m5* and *GT6m6*

genes are not found in the human genome. A further difference between the rat and human genomes is the existence of a single *ABO* gene in human (Fig. 2). The human *iGb3S* gene is localised on chromosome 1 in a region orthologous to that of the rat genome where the rat *iGb3S* gene lies. Two processed pseudogenes are found in the human genome, a pseudo *GGTA1* on chromosome 12 and a fragment of *ABO* on chromosome 19. The organisation of the GT6 family is similar in the mouse genome, with most members in a genomic region of chromosome 2, orthologous to rat 3p11-3p13 and to human 9q34. Like in the rat and human genomes, the *iGb3S* locus is unlinked to the other members, located on chromosome 4 in a region orthologous to rat 5q36 and human 1p35. A processed *Abo* pseudogene is present on chromosome 7. Similar to the rat genome, the mouse genome contains the *GT6m5* and *GT6m6* genes and like the human genome it presents one *Abo* gene only (not shown). Surfeit gene cluster (*Surf1*, *Surf2*, *Surf4*, *Surf5*, *Surf6*) is closely linked to *Abo* in mammalian genomes. In *Xenopus*, *Surf6* is found on the same scaffold about 50 kb upstream of *ABO-L3*. In zebrafish, it is on the same chromosome and there are about 13.7 Mb between *Surf5* and the *Abo* cluster. This shows a conserved synteny between *Surfeit* genes and the GT6 family members throughout vertebrates evolution.

The organisation of the coding regions in the rat GT6 genes is shown on Fig. 3A. The two last exons are the largest and code for the catalytic domain. The intracytoplasmic domain, the transmembrane domain and the stem region are encoded by three to five small exons depending upon the gene. The size of introns is also variable from gene to gene. These characteristics are found in all GT6 family members of other species as shown for a few selected examples on Fig. 3B. Sequence comparisons indicate that nearly all homologies are concentrated in the two last exons that correspond to the known or potential catalytic domains, almost no homologies exist between sequences of the 5' exons.

Evolution of the GT6 gene family

In order to get insights into the long term evolution of the GT6 family, data banks were searched for sequences presenting clear homologies to the known members described above. Sequences clearly belonging to the family were retrieved from various mammalian species, a bird, a frog and four bony fishes species. A related gene could also be found in bacteria but none were obtained from invertebrates. In order to make comparisons possible between the different species, we only used sequences retrieved from genomes from which a high coverage, assembled or not, was available. Individual GT6 family members can be found from various other species. Yet, the absence of other GT6 sequences in those species may simply indicate a lack of information rather than an absence of the corresponding gene. The retained species were thus, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Bos taurus* and *Monodelphis domestica* for mammals, the domestic fowl *Gallus gallus* as the only bird species, the frog *Xenopus tropicalis*, and the fishes *Takifugu rubripes* (Fugu), *Tetraodon nigroviridis* (puffer fish), *Danio rerio* (zebrafish) and *Oryzias latipes* (medaka). Sequence alignments generate two major subgroups as shown on Fig. 1A and Fig. 1B, respectively. The first one contains the ABO and FS-related sequences and the second one the Ggta1, iGb3S, GT6m5, GT6M6 and GT6m7 related sequences. Many primates GT6 sequences can be found and the chimpanzee genome is now fully sequenced, but since our aim was to analyse the long term evolution of the family, we decided to present only human sequences in the present analysis as representative of the primates group. With the exception of human, chimpanzee, and opossum, GT6m5 and GT6m6 were found in all mammalian species for which sufficient genomic data are available. GT6m7 is present in all mammals, except opossum. Yet, the human sequence contains a premature stop codon in the last exon. If the corresponding protein has a biological activity it is certainly lost in humans. Orthologues to GT6m5, GTm6 and GT6m7 could not be found outside the mammalian group.

A phylogenetic analysis was performed using the catalytic domain or potential catalytic domain sequences, as shown on Fig. 4A and B. The two major branches with the ABO and FS-related sequences on one side and the Ggta1, iGb3S, GT6m5, GT6m6, GT6m7 on the other side are clearly visible. As expected, among mammals, the opossum sequences are more distant, but can be clearly ascribed to an orthologous group. The only exception is a sequence which lies between Ggta1 and GT6m6. Since GT6m5, GT6m6 and GT6m7 could not be found in opossum, this gene could be their ancestor. Alternatively, it could result from an independant duplication of Ggta1 in the opossum lineage. Within the first main branch, mammalian Abo sequences are grouped. Some species, such as man, mouse, pig and cow, present a single *Abo* gene, while others, such as rat and dog present several. Eight xenope (*Xenopus tropicalis*) sequences related to Abo are found. Since it is not yet known if they correspond to active enzymes with either an A or B activity, they have been termed Abo-like. The other subgroup of this main branch corresponds to Forssman or Forssman-like synthase. The only GT6 member found in the chicken genome, belongs to that subgroup. The zebrafish genome has five distinct Forssman-like sequences, at variance with the other fishes which have none. The second main branch of the tree shows an iGb3S subgroup with all the mammalian sequences and two sequences from each of the three fishes fugu, tetraodon and medaka. The latter were termed iGb3S-like since the enzyme activity has not been described for any of these fish sequences. Surprisingly, no such sequence was found in the zebrafish genome. Of the three new genes *GT6m5*, *GT6m6* and *GT6m7* described above, *GT6m6* is the most closely related to *Ggta1*. In addition to the iGb3S-like sequences, each of the three fish species, medaka, fugu and tetraodon possesses one more sequence of the GT6 family that cannot be unambiguously ascribed to one of the two main branches. These new sequences cannot be considered orthologous to one of the other GT6 family member and we called them GT6m8 for GT6 family member 8. Finally, the *Escherichia coli* sequence is used as an

outgroup. Its region corresponding to the catalytic domain shows 11% identity with rat Abo1 and clearly belongs to the GT6 family as judged from its homology with all other members of the family. This is unambiguously confirmed by the recent demonstration of its B blood group enzyme activity (Yi et al. 2006).

It appears that irrespective of whether they correspond to active enzymes or not, the number of GT6 members largely differ from genome to genome even within phylogenetically related subgroups like mammals or bony fishes. Individual genes of the GT6 family have thus expanded or contracted by duplications and deletions in the course of their evolution.

DISCUSSION

Three new mammalian GT6 members were described, but it is not clear if they are functional in any species. Both GT6m5 and GT6m7 lack several motifs that appear essential for catalytic activity, in particular for binding to the donor substrate and the divalent cation. Not so surprisingly, we were unable to demonstrate any enzyme activity for rat GT6m5 and preliminary assays using a limited number of substrates on macaque GT6m7 were negative as well (data not shown). *GT6m5* and *GT6m7* could thus correspond to pseudogenes. Phylogenetic analysis indicated that GT6m5, GT6m6 and GT6m7 evolved faster than the other mammalian GT6 members since they formed longer branches within the mammalian group. This would suggest that they benefit from lower structural constraints to maintain a biological function or more likely, that they are easily dispensable so that less negative selection was exerted in the past on these three GT6 genes as compared to the others. Yet, their conservation without gross alterations in distant mammalian genomes is surprising. It contrasts with the accumulation of nonsense mutations or deletions in *Ggtal* of apes on a much shorter period of time (Koike et al., 2002). Whether they have any function at all thus remains to be seen. Unlike the two previous sequences, GT6m6 shows a good conservation of all essential motifs. Yet, we were unable to demonstrate enzyme activity of rat GT6m6. Our data indicate that it does not possess a redundant activity with the previously known GT6 enzymes. If it has an enzyme activity, it may not correspond to the addition of a Gal or a GalNAc in α 1,3 linkage like other GT6 members. Even though within a glycosyltransferase family, the various enzymes generally transfer the same sugar residue, there are exceptions such as β 3GnT1, β 3GnT3 and β 3GnT5 which belongs to a galactosyltransferase family but catalyse the transfer of a GlcNAc or α 4GalT which closest homologue is an α 4GlcNAc transferase (Shiraishi et al., 2001; Steffensen et al., 2000; Togayachi et al., 2001; Zhou et al.,

1999). It is thus possible that GT6m6 transfers a sugar other than Gal and GalNAc. Alternatively, it may be non functional in rat but functional in other species like human Forssman synthase that is inactive even though it does not show obvious sequence alterations (Xu et al., 1999).

Phylogenetic studies are limited by the large divergence of orthologous sequences when a long phylogenetic scale is considered. They are also limited by the lack or partial nature of data from many important species and by the difficulty in genome reconstruction from crude sequences. Thus, distinguishing allelic sequences from paralogues is not necessarily straightforward. Considering these limitations, we concentrated on sequences unambiguously belonging to the GT6 family because of important homologies with well known GT6 members characterised by the presence of at least some of the previously defined functional motifs, by the overall conservation of the gene structure and by their syntenicity in the genome. Sequences with clear features characteristic of the GT6 family were found in all vertebrates species for which data are available but could not be unambiguously detected in invertebrates. Peptide sequences showing weak homologies with GT6 members were found in anophelids, but it is not clear if they correspond to GT6 proteins since they do not present any of the conserved motifs characteristic of the family in vertebrates. Nevertheless, some invertebrate species express carbohydrate antigens related to histo-blood group antigens. The A antigen or A-like antigen has recently been detected in oysters with anti-A mAbs or the HPA lectin. It is recognized by human norovirus strains that use it as a ligand both in oysters, concentrating the virus, and in human where the virus replicates, causing gastroenteritis (Le Guyader et al., 2006). Likewise, HPA binding sites have been found in species belonging to other invertebrates orders, indicating the presence of terminal α GalNAc residues (Evangelista et al., 2002; Fang and Welsch, 1995). The enzymes involved in the synthesis of these invertebrates carbohydrate structures may be phylogenetically too distant to allow unambiguous

classification in the GT6 family. Alternatively, they may be unrelated enzymes or they may be absent from data banks. The presence of bacterial sequences clearly belonging to the GT6 family, is probably due to lateral transfer (Yi et al., 2006).

Although it was not possible to find an orthologue of the common GT6 ancestor, a scenario of the GT6 family evolution in vertebrates can be proposed (Fig.5). Three GT6 subfamilies, likely deriving from a common ancestor, are already present in teleost fishes, *FS-like*, *iGb3S-like* and a member with no clear mammalian orthologue, *GT6m8*. The latter has probably been lost from all terrestrial vertebrates. In this scenario, *FS-like* would be the ancestor of both *FS* and *ABO* through a duplication that occurred in an ancestor of amphibians. *iGb3S-like* would have been duplicated in a mammalian ancestor giving rise to *iGb3S* and *Ggta1*. Since then, the latter has been duplicated twice, first to generate an ancestor of *GT6m5* and *GT6m7* and more recently to generate *GT6m6*. Considering the long time scale, chromosome localisations in mammals are compatible with this model since *Abo* and *FS* are close from each other, *Ggta1*, *GT6m6* and *GT6m7* are next to each other, whereas *iGb3S* is on a distinct chromosome. According to the species considered, some gene members have been further duplicated or inversely have been lost. The chicken genome, which is the only bird species for which near complete genomic information is available, has only one GT6 member with high homology to Forssman synthase. Consistent with the absence of A or B antigens as well as of the α Gal xenoantigen in chicken and the presence of Forssman glycolipid in chicken and ostrich (Bouhours et al., 1999, Oriol et al., 1999), it indicates that the evolutionary branch leading to birds has lost the genes of at least two GT6 subfamilies. The single amphibian genome (*Xenopus tropicalis*) available for analysis presents eight genes related to the *ABO* subfamily and none to the other subfamilies. Since these genes are located in tandem in the genome they probably occurred by repeated duplications from a common ancestor. Surprisingly, none of the other GT6 subfamilies were represented in *Xenopus*, although they

were found in mammals. The large number of *ABO-like* genes in *Xenopus tropicalis* is compatible with the large number of A and B blood group typical and unusual structures characterised from the jelly coat of various frogs eggs (Coppin, et al., 2003; Delpace et al., 2002; Strecker et al., 1995). Opposum is a representative of marsupial mammals which diverged from placental mammals about 170 million years ago. Four GT6 members were found in its genome. An *Abo* gene, a *FS* gene, a *Ggtal* gene and a gene related to *Ggtal* that could correspond either to an opossum specific duplication or that could be an ancestor of *GT6m5*, *GT6m6* or *GT6m7*. All GT6 members derived from the ancestors of *FS* and *iGb3S* are represented in mammals. Yet, important differences exist among species in this group with the expansion of the *Abo* gene in some species and the complete loss or the loss of function of other genes in other species. Thus, of all GT6 family members, only the products of the A and B alleles at the *ABO* locus are functional in human. *GGTA1* is inactivated, *FS* is inactivated, *iGb3S* appears inactivated because of promoter alterations and of aberrant splicing (Milland et al., 2006; Taylor et al., 2003), *GT6m7* is inactivated and both *GT6m5* and *GT6m6* are lacking. This situation of expansion or deletion of genes of a given family in distinct species is typical of the model of birth-and-death evolution described by Nei and colleagues at variance with models of divergent evolution or concerted evolution (Nei and Rooney, 2005). Birth-and-death evolution of a multigene family is characterised by the creation of new genes by duplication that can be maintained in the genome for long periods of time whereas some duplicates are deleted or inactivated through mutations. This model of evolution seems to apply particularly well to gene families involved in interactions with the environment since the selective pressures exerted on species living in different environments will not be identical. They include gene families of the immune system, such as the MHC, the NK receptors and defensins, or of the sensory systems, such as the taste and olfactory receptors (Conte et al., 2003; Hao and Nei, 2004; Hao and Nei, 2005; Lynn et al., 2004; Nei et

al., 1997; Niimura and Nei 2003). Although the biological roles of the GT6 family members are not well defined as yet, evidence has accumulated suggesting that they play roles in interactions with pathogens and in innate immunity. The A and B antigens are ligands for some pathogens and this correlates with sensitivity to the pathogen as recently shown for some norovirus strains (Le Pendu et al, 2006; Tan and Jiang, 2005). The Forssman antigen is a ligand of pathogenic *Escherichia coli* strains. Its absence from some species prevents cross-species transmission of these pathogenic bacteria (Xu et al., 1999). Natural antibodies against the A and B antigens as well as against the α Gal xenoantigen synthesised by Ggt1 may respectively restrict the intraspecies or transspecies spread of viruses expressing the corresponding antigens (Neil et al., 2005, Rother et al., 1995, Seymour et al., 2004, Takeuchi et al., 1996). The iGb3 glycolipid was recently shown to be an endogenous ligand for mouse iNKT lymphocytes (Zhou et al., 2004). These nonconventional lymphocytes recognise glycolipids presented by the CD1d molecule to an invariant T cell receptor. They play essential roles at the interface between the innate and adaptative immune responses and are involved in anti-bacterial responses in the control of autoimmunity as well as in the immunity against cancer cells (Godfrey and Kronenberg, 2004). They can directly recognise some bacterial glycolipids or regulate immune responses after recognition of an endogeneous glycolipid (Mattner et al., 2005). The B blood group antigen is a developmentally regulated marker of some sensitive neurons, suggesting that it could be involved in hearing and olfaction (Astic et al., 1989, Mollicone et al., 1985). In this respect it is interesting to note that a main site of expression of GT6m5 and GT6m6 was the olfactory bulb. It has also been suggested that oligosaccharides synthesised by members of the GT6 family could participate in gametes interaction, although this is debated (Johnston et al., 1998; Litscher et al., 1995). Amphibians show a large repertoire of such oligosaccharides on their jelly coat that differ from species to species. They could play a role in species specific gametic interaction (Coppin

et al. 2003). Such a role would be highly compatible with the birth-and-death evolution character of the GT6 family since a distinct set of genes in different species would be required.

In conclusion, we have shown that the GT6 family has more members than previously appreciated although it is not clear if the new genes described are functional in any species. Likewise, the biological activities of the ABO, Forssman synthase and iGb3 synthase found in fishes, frog or bird remain to be demonstrated. A long term phylogenetic analysis of the GT6 family in vertebrates shows a clear mode of birth-and-death evolution consistent with the putative biological functions of the various members of the family.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of rat GT6m5, GT6m6 and α 3GalT (Ggta1)

Cloning of these cDNAs was performed before the release of the rat genome sequences in data banks and the sequence were deposited on the NCBI site.

Identification and cloning of GT6m5: Briefly, a BLAST search using the mouse α 3GalT sequence (M 85153) revealed the existence of unknown rat expressed sequence tags (EST). Screening by RT-PCR of various rat cell lines and tissues showed that a corresponding sequence could be amplified from the mammary carcinoma cell line MT450 and from testis. The complete coding sequence was obtained by RACE-PCR using the Marathon cDNA Amplification kit (Clontech) from the MT450 and the testis cDNA libraries. It was then amplified from the rat testis cDNA library. Three isoforms were identified (966 bp, 828 bp, 744 bp). The longest isoform was then cloned in the pCR3.1+ vector (Invitrogen) and sequenced.

Identification and cloning of GT6m6: In order to search for new members of the GT6 family, degenerated primers (MotAB2 and MotAB3i), deduced from the then available sequences of the *ABO* and *Ggta1* genes in various mammalian species, were used to amplify a fragment of 200 bp. New primers were designed from this fragment. Elongation in the 3' direction was performed on rat Genome Walker cDNA library (Clontech). Elongation in the 5' direction was performed on a rat stomach cDNA. The complete coding sequence was obtained from the rat testis cDNA library and the product was cloned in pcDNA3.1+.

Cloning of the rat Ggta1: The degenerated primers used to obtain the GT6m6 sequence allowed to isolate a second fragment of 200 bp. Both 3' and 5' direction elongations were performed on a rat stomach cDNA library by RACE-PCR using the Marathon cDNA

Amplification kit (Clontech). The complete coding sequence was obtained from the rat testis cDNA library. The product was cloned in the pCR3.1+ vector.

Sequence analysis, chromosome localisation and phylogenic analysis

Sequences belonging to the GT6 family were searched using BLASTN, TBLASTN and BLAT with default parameters from all genomic and EST sequences available in the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>), MEDAKA project (<http://dolphin.lab.nig.ac.jp/medaka/index.php>) and FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/blast/>) databases. Human and rat sequences were used as queries in the first round of search. The retrieved chicken, xenopus and fish sequences were used as queries in a second round of search to ensure completeness of the search process. Since we aimed at analyzing the long-term evolution of GT6 family, only human sequences were considered for primates. All genomic sequences allowing to generate a complete catalytic domain, thus a potentially functional enzyme, were considered. The only exception was the human GT6m7 gene which contains a stop codon that should lead to a truncated catalytic domain. Since this nonsense codon is not present in the chimpanzee orthologous sequence and that a single nucleotide change could generate a full coding peptide sequence, the corrected human sequence was used. The human Forssman synthase sequence was also included since it corresponds to a full-length protein although it is known to be a non functional enzyme. Processed pseudogene were excluded from the analysis. Since no sequence fulfilling the above criteria could be retrieved from invertebrate genomic data, the study was restricted to vertebrates. All sequences and their accession numbers used in the study are listed in Table 1. Approximate localisation of transmembrane regions were determined using the TMHMM program available from CBS prediction servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services>). Multiple alignments were performed with ClustalW 1.8

(http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/nucleic_acid-search.html). Phylogenetic trees were constructed by using the Neighbor-Joining method with p distances and 1000 bootstrap replicates using the MEGA3 program (www.megasoftware.net/).

Acknowledgements

This work was supported in part by the Association for International Cancer Research (AICR), by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. We also thank Dr. G. Strecker (Université des Sciences et des Technologies de Lille, France) for his gift of purified milk oligosaccharides.

Abbreviations

FS: Forssman synthase; Gal: galactose; GalNAc: N-acetylgalactosamine; Ggt1: α 1,3galactosyltransferase; GT6: glycosyltransferase 6 family; GT6m5: glycosyltransferase family member 5; GT6m6: glycosyltransferase family member 6; GT6m7: glycosyltransferase family member 7; iGb3S: isogloboside 3 synthase; LBR: ligand binding region.

REFERENCES

- Astic, L., Le Pendu, J., et al. (1989) Cellular expression of H and B antigens in the rat olfactory system during development. *J Comp Neurol*, 289, 386-394.
- Boix, E., Swaminathan, G.J., et al. (2001) Structure of UDP complex of UDP-galactose: β -galactoside- α -1,3-galactosyltransferase at 1.53-Å resolution reveals a conformational change in the catalytically important C terminus. *J Biol Chem*, 276, 48608-48614.
- Boix, E., Zhang, Y., et al. (2002) Structural basis of ordered binding of donor and acceptor substrates to retaining glycosyltransferase, α 1,3-galactosyltransferase. *J Biol Chem*, 277, 28310-28318.
- Bouhours, D., Liaigre, J., et al. (1999) Forssman penta- and tetraglycosylceramide are xenoantigens of ostrich kidney and liver. *Glycobiology*, 9, 875-886.
- Cailleau-Thomas, A., Le Moullac-Vaidye, B., et al. (2002) Cloning of a rat gene encoding the histo-blood group A enzyme. *Eur J Biochem*, 269, 4040-4047.
- Conte, C., Ebeling, M., et al. (2003) Evolutionary relationship of the Tas2r receptor gene families in mouse and human. *Physiol genomics*, 14, 73-82.
- Coppin, A., Florea, D., et al. (2003) Comparative study of carbohydrate chains released from the oviducal mucins of the two very closely related amphibian species *Bombina bombina* and *Bombina variegata*. *Biochimie*, 85, 53-64.
- Delpace, F., Maes, E., et al. (2002) Species specificity of O-linked carbohydrate chains of the oviducal mucins in amphibians: structural analysis of neutral oligosaccharide alditols released by reductive beta-elimination from the egg-jelly coats of *Rana clamitans*. *Biochem J*, 363, 457-471.
- Evangelista, L.G. and Leite, A.C. (2002) Histochemical localization of N-acetyl-galactosamine in the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, 39, 432-439.
- Fang, Y.O. and Welsch, U. (1995) A histochemical study of the distribution of lectin binding sites in the developing oocytes of the lancelet *Branchiostoma belcheri*. *Cell Tissue Res*, 280, 427-434.
- Galili, U. (2001) The alpha-gal epitope (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie*, 83, 557-563.
- Gastinel, L.N., Bignon, C., et al. (2001) Bovine α 1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases. *Embo J*, 20.
- Godfrey, D.I. and Kronenberg, M. (2004) Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*, 114, 1379-1388.
- Hao, L. and 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, 343-354.
- Hao, L. and Nei, M. (2005) Rapid expansion of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in primates and their coevolution with MHC class I genes. *Gene*, 347, 149-159.
- Haslam, D.B. and Baenziger, J.U. (1996) Expression cloning of Forssman glycolipid synthetase: a novel member of the histo-blood group ABO gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10697-10702.
- Heissigerova, H., Breton, C., et al. (2003) Molecular modeling of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of blood group A, blood group B, Forssman and iGb3 antigens and their interaction with substrates. *Glycobiology*, 13, 377-386.
- Hennet, T. (2002) The galactosyltransferase family. *Cell Mol Life Sci*, 59, 1081-1095.

- Iwamoto, S., Kumada, M., et al. (2002) Rat encodes the paralogous gene equivalent of the human histo-blood group *ABO* gene. *J Biol Chem*, 277, 46463-46469.
- Johnston DS, Wright WW, et al. (1998) Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide. *J Biol Chem*, 273, 1888-1895.
- Keusch, J.J., Manzella, S.M., et al. (2000) Expression cloning of a new member of the ABO blood group glycosyltransferases, iGb₃ synthase, that directs the synthesis of isogloboglycosphingolipids. *J Biol Chem*, 275, 25308-25314.
- Koike, C., Fung, J.J., et al. (2002) Molecular basis of evolutionary loss of the α 1,3-galactosyltransferase gene in higher primates. *J Biol Chem*, 277, 10114-10120.
- Le Guyader, F., Loisy, F., et al. (2006) Norwalk-virus specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg Infect Dis*, 12, 931-936.
- Le Pendu, J., Ruvoën-Clouet, N., et al. (2006) Mendelian resistance to human norovirus infection. *Sem Immunol*, 18, 375-386.
- Litscher, E.S., Juntunen, K., et al. (1995) Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro. *Biochemistry*, 34, 4662-4669.
- Lynn, D.J., Lloyd, A.T., et al. (2004) Evidence of positively selected sites in mammalian alpha-defensins. *Mol Biol Evol*, 21, 819-827.
- Mattner J, Debord KL, et al. (2005) Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature*, 434, 525-529.
- Milland, J., Christiansen, D., et al. (2006) The molecular basis for galalpha(1,3)gal expression in animals with a deletion of the alpha1,3galactosyltransferase gene. *J Immunol*, 176, 2448-2454.
- Mollicone, R., Trojan, J., et al. (1985) Appearance of H and B antigens in primary sensory cells of the rat olfactory apparatus and inner ear. *Brain Res*, 349, 275-279.
- Nei, M., Gu, X., et al. (1997) Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 7799-7806.
- Nei, M. and Rooney, A.P. (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet*, 39, 121-152.
- Neil, S.J., McKnight, A., et al. (2005) HIV-1 incorporates ABO histo-blood group antigens that sensitize virions to complement-mediated inactivation. *Blood*, 105, 4693-4699.
- Niimura, Y. and Nei, M. (2003) Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci*, 100, 12235-12240.
- Oriol, R., Candelier, J., J, et al. (1999) Major carbohydrate epitopes in tissues of domestic and African wild animals of potential interest for xenotransplantation research. *Xenotransplantation*, 6, 79-89.
- Patenaude, S.I., Seto, N.O.L., et al. (2002) The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nature Struct Biol*, 9, 685-690.
- Rother, R.P., Fodor, W.L., et al. (1995) A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med*, 182, 1345-1355.
- Seymour, R.M., Allan, M.J., et al. (2004) Evolution of the human ABO polymorphism by two complementary selective pressures. *Proc Biol Sci*, 271, 1065-1072.
- Shetterly, S., Tom, I., et al. (2001) Alpha1,3galactosyltransferase: new sequences and characterization of conserved cysteine residues. *Glycobiology*, 11, 645-653.
- Shiraishi, N., Natsume, A., et al. (2001) Identification and characterization of three novel beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferases structurally related to the beta 1,3-galactosyltransferase family. *J Biol Chem*, 276, 3498-3507.

- Steffensen, R., Carlier, K., et al. (2000) Cloning and expression of the histo-blood group Pk UDP-galactose: Gal β 4Glc β 1-cer α 1, 4-galactosyltransferase. Molecular genetic basis of the p phenotype. *J Biol Chem*, 275, 16723-16729.
- Strecker, G., Wieruszeski, J.M., et al. (1995) Primary structure of 12 neutral oligosaccharide-alditols released from the jelly coats of the anuran *Xenopus laevis* by reductive beta-elimination. *Glycobiology*, 5, 137-146.
- Takeuchi, Y., Porter, C.D., et al. (1996) Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (α 1-3)galactosyltransferase. *Nature*, 379, 85-88.
- Tan, M. and Jiang, X. (2005) Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol*, 13, 285-293.
- Taylor, S.G., McKenzie, I.F., et al. (2003) Characterization of the rat α (1,3)galactosyltransferase: evidence for two independent genes encoding glycosyltransferases that synthesize Gal α (1,3)Gal by two separate glycosylation pathways. *Glycobiology*, 13, 327-337.
- Togayachi, A., Akashima, T., et al. (2001) Molecular cloning and characterization of UDP-GlcNAc:lactosylceramide β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (β 3Gn-T5), an essential enzyme for the expression of HNK-1 and Lewis X epitopes on glycolipids. *J Biol Chem*, 276, 22032-22040.
- Turcot, A.L., Blancher, A., et al. (2003) Cloning of a rat gene encoding the histo-blood group B enzyme: Rats have more than one *Abo* gene. *Glycobiology*, 13, 919-928.
- Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 2, 97-130.
- Xu, H., Storch, T., et al. (1999) Characterization of the human Forssman synthetase gene. *J Biol Chem*, 274, 29390-29398.
- Yamamoto, F. (2000) Molecular genetics of ABO. *Vox Sang*, 78, 91-103.
- Yi, W., Zhu, L., et al. (2006) Formation of a new O-polysaccharide in *Escherichia coli* O86 via disruption of a glycosyltransferase gene involved in O-unit assembly. *Carbohydr Res*, 341, 2254-2260.
- Zhou D, Mattner J, et al. (2004) Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science*, 306, 1786-1789.
- Zhou, D., Dinter, A., et al. (1999) A β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase with poly-N-acetyllactosamine synthase activity is structurally related to β 1,3-galactosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci*, 96, 406-411.

TABLE 1

Protein sequences used in the phylogenetic analysis

Specie	Name	Acces number
Cow	ABO	XP_593344
Dog	ABO	XP_548386
Dog	ABO-2	XP_848530
Dog	ABO-3	XP_533698
Dog	ABO-4	XP_94983
Human	ABO	AAD26572
Opossum	ABO	ENSMODP00000015895
Rat	ABO-1	AAF74758
Rat	ABO-2	NP_075582
Rat	ABO-3	XM_215986
Mouse	CisAB	BAB20560
Cow	FS	XP_875942
Dog	FS	NP_001003193
Human	FS	NP_068836
Mouse	FS	AAI06832
Opossum	FS	ENSMODP00000015847
Chicken	FS-L	CAG31389
Zebrafish	FS -L1	NP_956623
Zebrafish	FS-L2	XP_694848
Zebrafish	FS-L3	NP_001004620
Zebrafish	FS-L4	NP_956419
Zebrafish	FS -L5	XP_692352
Cow	Ggt1	NP_803477
Dog	Ggt1	XP_548478
Mouse	Ggt1	AAH06810
Opossum	Ggt1	ENSMODP00000012258
Rat	Ggt1	AAM74957
Cow	iGb3S	XP_875093
Dog	iGb3S	XP_544424
Human	iGb3S	XP_060537
Mouse	iGb3S	NP_001009819
Rat	iGb3S	AAH61714
Tetraodon	iGb3S-L1	CAG07026
Tetraodon	iGb3S-L2	CR693289
Fugu	iGb3S-L1	CAAB01000779.1
Fugu	iGb3S-L2	CAAB01009124.1
Medaka	iGb3S-L1	GOLWno1009_b18.g1
Medaka	iGb3S-L2	GOLWno7215_e08.b1
Cow	GT6m5	XP_603445
Dog	GT6m5	ENSCAFP00000005504
Mouse	GT6m5	BAB30163
Rat	GT6m5	AAS92273
Cow	GT6m7	XP_608420
Dog	GT6m7	XP_548383
Human	GT6m7	NP_892019
Mouse	GT6m7	NP_001034184
Rat	GT6m7	XP_231076
Cow	GT6m6	XP_605800
Dog	GT6m6	ENSCAFP00000005509
Mouse	GT6m6	XP_130219
Rat	GT6m6	AAS92274
Xenopus	ABO-L1	to be submitted
Xenopus	ABO-L2	CR761276
Xenopus	ABO-L3	NP_001017104
Xenopus	ABO-L4	to be submitted
Xenopus	ABO-L5	to be submitted
Xenopus	ABO-L6	to be submitted
Xenopus	ABO-L7	CR760204
Xenopus	ABO-L8	to be submitted
Opossum	Opos 4	ENSMODP00000024525
Medaka	GT6m8	GOLWno1871_l18.g1
Fugu	GT6m8	CAAB01000119.1
Tetraodon	GT6m8	CAG01398
Escherichia coli	GT6	AAO37716

FIGURE LEGENDS

Figure 1: A/ ClustalW alignment of the peptide sequences corresponding to the catalytic or putative catalytic domains of GT6 family members related to the A or B enzymes and to Forssman synthase. White letters on black background represent highly conserved positions and white letters on grey background represent less well conserved positions. The two GT6 conserved cysteins are marked with asterisks. The ligand binding regions determined by Heissigerova et al. (Heissigerova et al. 2003), labeled from A to I, are underlined.

B/ ClustalW alignment of the peptide sequences corresponding to the catalytic or putative catalytic domains of GT6 family members related to iGb3synthase and Ggta1.

Figure 2: Chromosome localisation of the clustered GT6 family members in the rat, human, *Xenopus tropicalis* and Zebrafish genomes. Processed pseudogenes and the human and rat *iGb3S* gene located independently on chromosomes 1p35.1 and 5q36, respectively are not shown. Each GT6 family member is represented by a black arrow head and the direction of arrow head shows transcriptional orientation. A Surfeit locus, shown by a white arrow head, is used as a syntenic marker in each genome. The length of the gene clusters is given in megabases (Mb). Note that the scale bar is 1 Mb for human and rat and 0.1 Mb for xenopus and zebrafish. In the zebrafish genome, Surf5 is 15 Mb apart from FS-L5.

Figure 3: Genomic organisation of the coding determining regions of GT6 rat genes (A) and of selected GT6 genes (B) from other vertebrate species. Exons are represented by boxes, their size in bp is marked above them. The size of introns is indicated in bp below the line. All genes conserved the last two exons in 3' that encode the catalytic or putative catalytic

domains. The size and number of the exons in 5' as well as the size of introns are more variable. The scale bar is given in kilobases.

Figure 4: Neighbour-joining tree of GT6 protein sequences corresponding to the catalytic or putative catalytic domains from vertebrate species. The bootstrap value based on 1000 replications is shown for each interior branch wherever greater than 65%. The *Escherichia coli* blood group B enzyme (GT6 E coli) was used as the outgroup. Rattus= *Rattus norvegicus* (rat); Mus= *Mus musculus* (mouse); Homo= *Homo sapiens* (human); Bos= *Bos taurus* (cow); Canis= *Canis familiaris* (dog); Opos= *Monodelphis domestica* (Opossum); Gallus= *Gallus gallus* (chicken); Xenopus= *Xenopus tropicalis* (Xenopus); Fugu= *Takifugu rubripes* (fugu); Tetra= *Tetraodon nigroviridis* (puffer fish); Danio= *Danio rerio* (zebrafish); Meda= *Ozyria latipes* (medaka).

Figure 5: Evolutionary scenario of the GT6 family in vertebrates. Genes showing expansions (at least two members in a species) are shown by asterisks. GT6 members represented in bony fishes, amphibians, birds, marsupials and placental mammals are shown. The analysis was based on 4 species of fishes, 5 species of placental mammals and a single species of amphibians, birds, marsupials for which complete or near complete genomic sequences are available in data banks.

		LBR-A	LBR-B	* LBR-C	LBR-D
GT6m7_Rattus	1	RLDVIITTDMDAPVWEGTDRKVLERYHHQNIITGLTVFAVSSNGOVLFFIOSASFFMPCYRVIIYIMV--DKSLKLEEGHNPLOFOLIVUSCEPQMSDFDLMRMVTSKHIRDRHFVEVDFLEYSNNMVFQNVFCVETLSTVAQLHAWWYFRKTTHTLPIYERRPSTSAAY			
GT6m7_Mus	1	RLDVIITTDMDAPVWEGTDRKVLERYHHQNIITGLTVFAVSSGLTDKVLFFIOSASFFMPCYRVIIYIMV--DKYLOQOEHEHNPLOFOLIVUSCEPQMSDFDLMRMVTSKHIRDRHFVEVDFLEYSNNMVFQSEFGVETLSTVAQLHAWWYFRKRTNLTPIYERRPKSTSAH			
GT6m7_Homo	1	RPDVIITTDMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITVGLAVEFAT--GRLEABVLEPFFHISANHFMTCYRVIIYIMV--DAFFKLPDEPSPLOPFRABVGTESMM--LGGPVHVKSLCEHITASHIQDEVDVFLFSMAANVQFQNEFGVETLGPVLAQLHAWWYFRNTKNFPYERRPSTSAAC			
GT6m7_Canis	1	RPDVIITTDMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITVGLAVEFAT--GRLEABVLEPFFHISANHFMTCYRVIIYIMV--DAMCRIPNLEPGLQFOVFTTHRELSR--EIFFHMMKMNKASHILHQDEVDVFLFSMTANRVFQNDFGVETLGPVLAQLHAWWYFKDIKDFPYERRPSTSAAC			
GT6m7_Bos	1	RPDVIITTDMDAPVWEGTDRKVLERYHHQNIITGLTVFAV--GRLEABVLEPFFHISANHFMTCYRVIIYIMV--DTFKLPLOKWEPLROFVKVFTVESMM--DN--DVMRMKSAKHLIWDIQGQVDFLFSMTVQFQFQNNVGVETLGPVLAQLHAWWYFKDRASFYPYERRPSTSAAY			
Ggtal_Bos	1	RPDVIITTDMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITVGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
Ggtal_Canis	1	RPDVIITTDMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
Ggtal_Rattus	1	RPDVIITTDMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
Ggtal_Mus	1	RPDVIITTDMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m5_Mus	1	RPDVIATGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m5_Rattus	1	RPDVIATGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m5_Bos	1	RPDVIATGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m5_Canis	1	RPDVIATGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m6_Mus	1	----RANNSAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m6_Rattus	1	----RANNSAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m6_Bos	1	----RANNSAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m6_Canis	1	----RANNSAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S_Mus	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S_Rattus	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S_Canis	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S_Homo	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S_Bos	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m8_Tetra	1	----MPLENSWAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S-L1_Tetra	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S-L2_Tetra	1	-----MNPTFFDTHKDRASVLTVEFV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S-L1_Fugu	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S-L2_Fugu	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S-L1_Meda	1	-----MNPTFFDTHKDRASVLTVEFV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
iGb3S-L2_Meda	1	-----MNPTFFDTHKDRASVLTVEFV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m8_Meda	1	-----MNPTFFDTHKDRASVLTVEFV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6m8_Fugu	1	----MPLENSWAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
Ggtal_Opos	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
Opos_4	1	RPDVIITGMDAPVWEGTDRRVLEKHYRRNIITGLTVFAV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			
GT6_E_coli	1	-----MNPTFFDTHKDRASVLTVEFV--GRYLEHYLBEFTISANHFMTCYRVIIYIMV--DDVSRMPLLEGLPLRFKVKVKEKHEKRW--QDISMMRMKKTGEHIVAHIQHEVDVFLFCMDVDQVQFQDFKFGVETLGSVAQLHAWWYADPNDFPYERRKESAAAY			

		LBR-E	* LBR-F	LBR-G	LBR-H	LBR-I
GT6m7_Rattus	177	IPFGGLGDFYYACAHIGGVPFQVDFTHQYLSVILHITENGNSTY--SKYLNKYFFLLNKPPTKLLSPEYSWDPTFNIPQOVHYVKAHYPTDDL-----				
GT6m7_Mus	177	IPFGGLGDFYYACAHIGGVPFQVDFTHQYLSVILHITENGNSTY--SKYLNKYFFLLNKPPTKLLSPEYSWDPTFNLPRLHWFVKAHHPIDTL-----				
GT6m7_Homo	177	IPFGGGLGDFYYGNNVGGFPFHHDFDIKEYLNGVHHIKNGNSTY--SKHLNKYFFLLNKPPTKLLSPEYSWDLAFSPPPQIQYKKAHDSQRKL-----				
GT6m7_Canis	176	LLGEGGDFYYDPSSVGGTPELDFDIQEYLEGMIHDKNGNSTY--PRYLNKYFFLLNKPPTKLLSPEYSWDLALQPAQVWLKAAQCSHMCLHT-----				
GT6m7_Bos	176	IPFGGGLGDFYYDPSSVGGTPELDFDIQEYLEGMIHDKNGNSTY--PRYLNKYFFLLNKPPTKLLSPEYSWDLALQPAQVWLKAAQCSHMCLHT-----				
Ggtal_Bos	177	IPFGGGLGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
Ggtal_Canis	177	IPFGGGLGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
Ggtal_Rattus	177	IPFGGGLGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
Ggtal_Mus	177	IPFGGGLGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m5_Mus	177	IPFGGGLGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m5_Rattus	178	IAFEEGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m5_Bos	178	IPFEEGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m5_Canis	176	IPFGGGLGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m6_Mus	173	IAVGEEDGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m6_Rattus	173	IAVGEEDGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m6_Bos	173	IPFGGGLGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m6_Canis	173	IPFGGGLGDFYYHAAAFGGTPTQVQVNTIQCEFGILKDRKNDLEAOWHDESHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S_Mus	177	ISLSGEGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S_Rattus	177	ISLSGEGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S_Canis	177	IAVGEEDGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S_Homo	177	IAVGEEDGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S_Bos	156	IGGEGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m8_Tetra	174	VEEEDGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S-L1_Tetra	177	NE--RGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S-L2_Tetra	159	NE--TGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S-L1_Fugu	177	NE--RGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S-L2_Fugu	177	NE--TGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S-L1_Meda	105	NE--MGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
iGb3S-L2_Meda	131	NT--EGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m8_Meda	162	VEEEDGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6m8_Fugu	174	VEDDEGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
Ggtal_Opos	177	IPFGGGLGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
Opos_4	177	IPYDMDGDFYYHAAAFGGGVAALRLTAHCAATGQQLHKGREARWHDHSHLNKYFLNKPPTKLLSPEYCWYHGLPDAITLKKSMQOTREYNVVRNNV-----				
GT6_E_coli	138	IGYLLKGTYYGCFNNGKATSKFRLLQICNNMTTALKKNNIAKWADESYNNYYYNKPK--LALLSELSPPEKYGENKAAIIMRDKERESYGNIKK-----				

Figure 1B

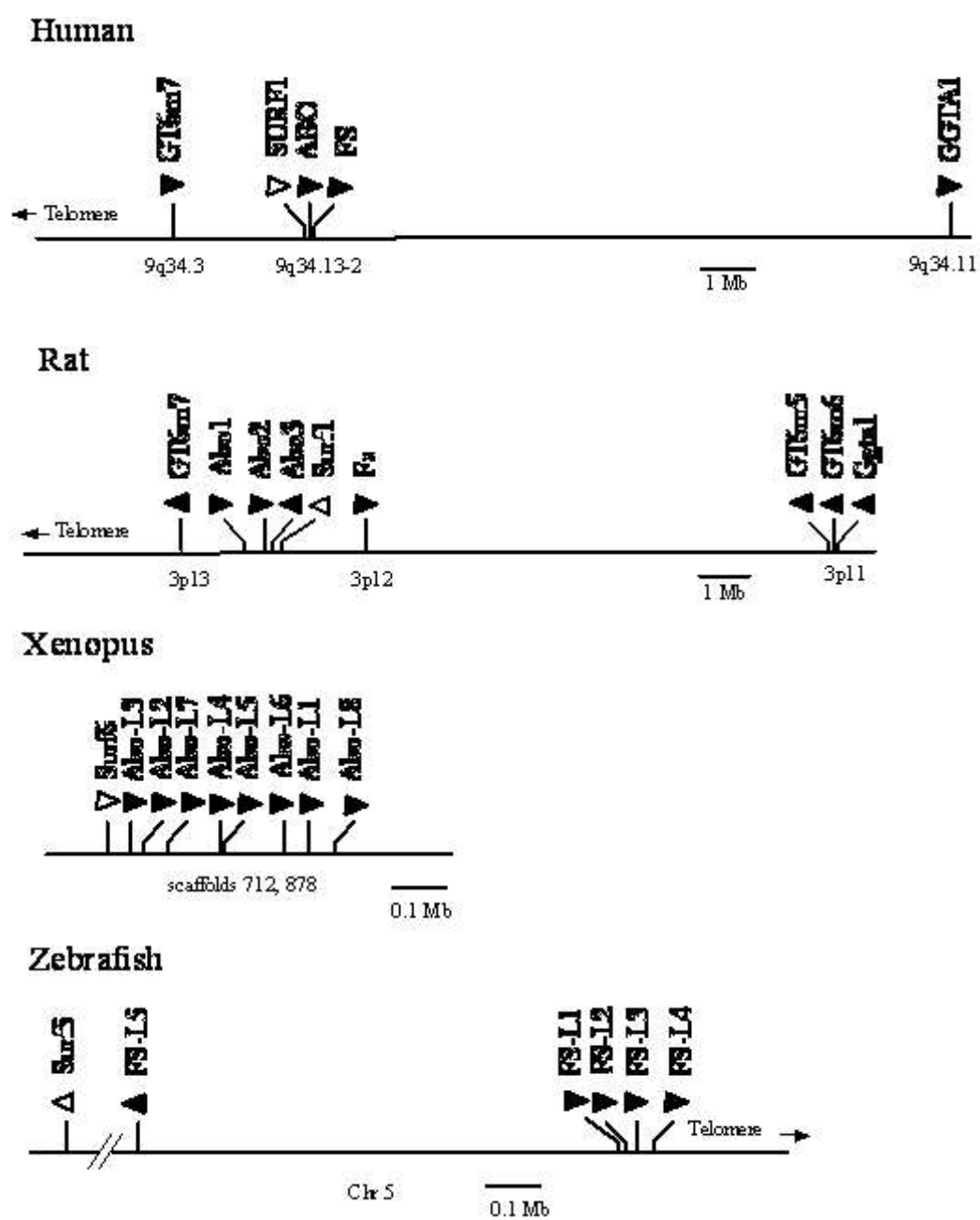


Figure 2

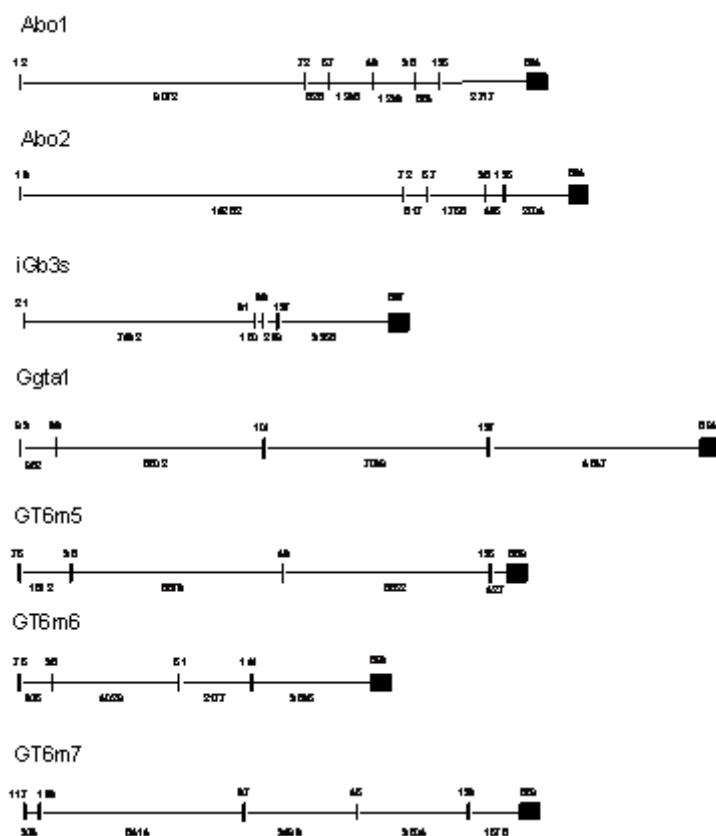
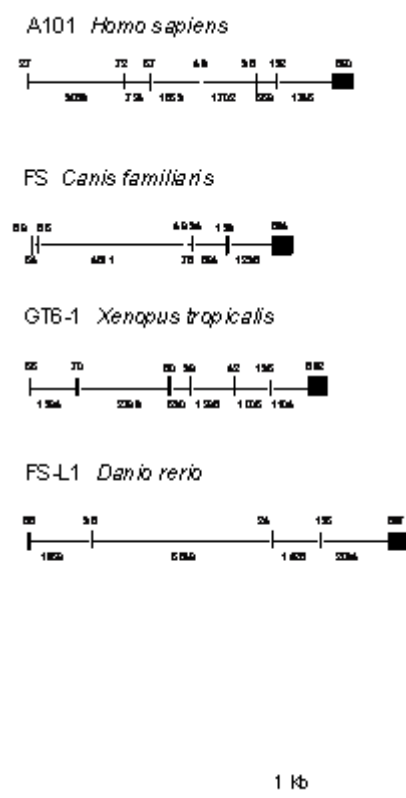
A**B**

Figure 3

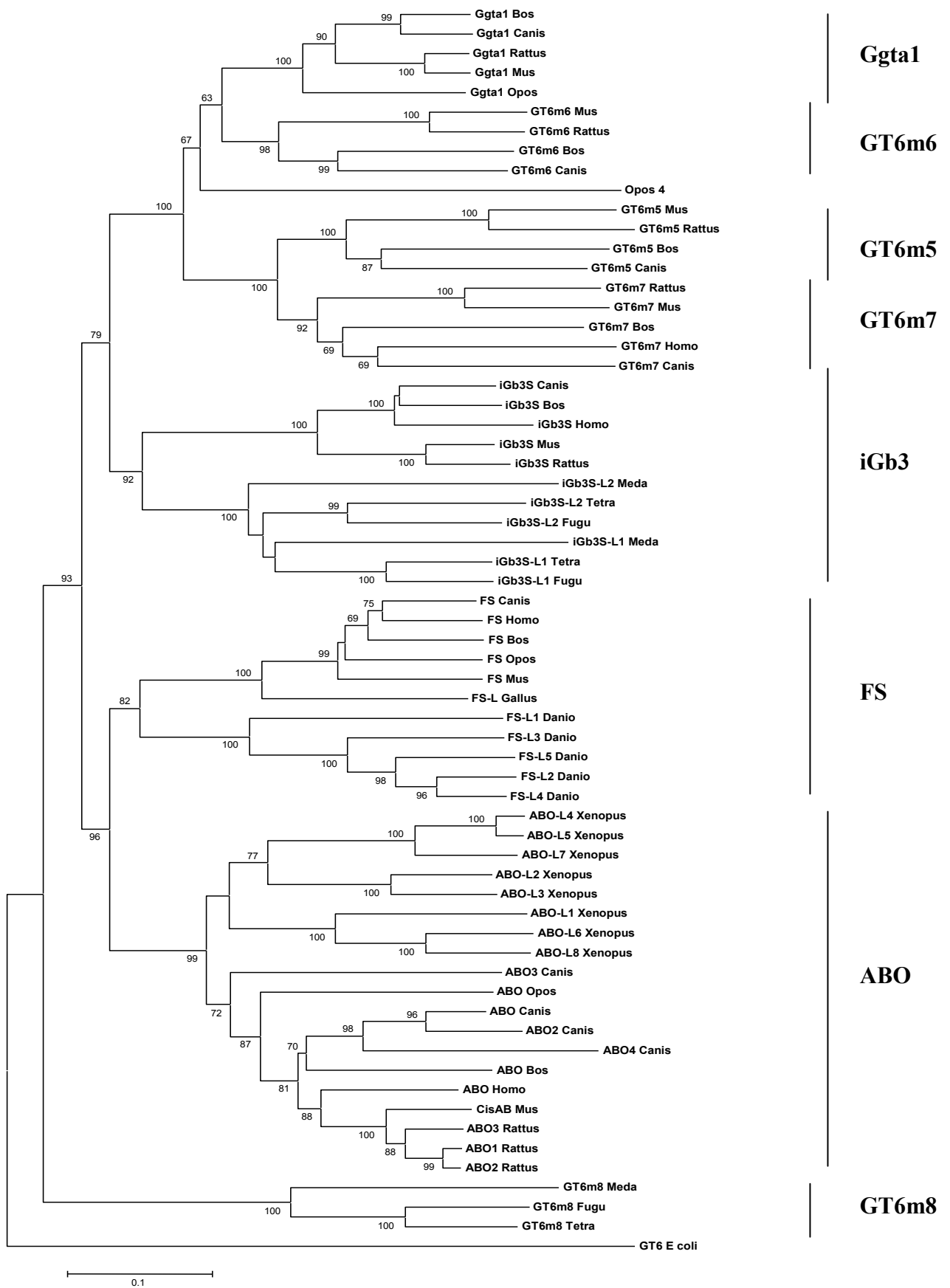


Figure 4

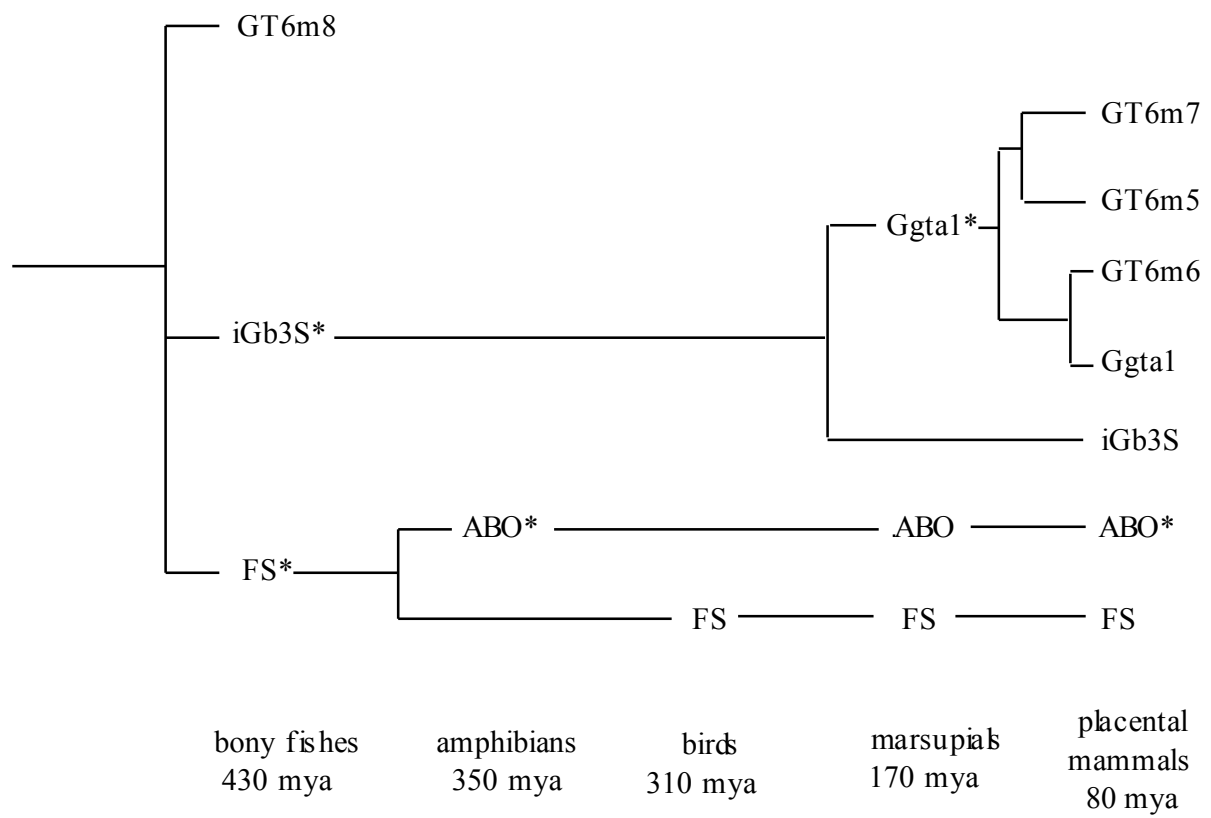


Figure 5

ADDITIONAL MATERIAL

Search of enzyme activity

CHO cells or CHO FTB cells, which express a rat α 1,2 fucosyltransferase cDNA (Cailleau-Thomas et al, 2002), were transiently transfected with either pCR3.1-GT6m5 or pcDNA3.1-GT6m6 using lipofectamineTM (Gibco BRL) according to the manufacturer's instructions. pCR3.1- α 3GalT and pcDNA3.1-enzyme A were used as transfection controls, for CHO or CHO FTB cells, respectively. Forty eight hours after transfection, cells were harvested and analyzed by flow cytometry. For this aim, $2 \cdot 10^5$ cells were incubated with the anti-A mAb 3-3A or the anti-B mAb ED3 at 10 μ g/ml in PBS 0.1% gelatin or with biotin labeled BS1-B4 isolectin (E-Y labs, San Mateo, CA) at 10 μ g/ml in PBS 0.1% gelatin for 1 h at 4°C. The anti-A and anti-B mAbs were kind gifts from Dr. J. Bara (Villejuif, France) and Dr. A. Martin (Rennes, France), respectively. They recognize all types of A or B antigens. The BS1 isolectin B4 recognizes galactose residues in alpha linkage. After washing with the same buffer, a second 1 h incubation was performed with a FITC-labeled anti-mouse IgG (Sigma) or with FITC-labeled extravidin (Sigma). Following three washes, fluorescence analysis was performed on a FACScan (Becton-Dickinson) using the CELLQUEST program.

To obtain a soluble truncated form of the enzymes, lacking the N terminal putative intracytoplasmic domain and transmembrane region, the rat GT6m5 cDNA was digested with Xho I which cleaves in the putative stem region at nucleotide 136 (numbering beginning at the start codon). The truncated cDNA was then cloned in the pSecTag2b vector (Invitrogen). The complete rat GT6m6 coding sequence was first isolated from pcDNA3.1+ by digestion with Pme I. It was inserted in pSecTag2a through EcoR V. Then, the cDNA was truncated by digestion with Pst I, which allows the deletion of the 5' region coding for the cytosolic and transmembrane domain at nucleotide 92. The constructs were then sequenced for verification.

A truncated form of the rat A enzyme cDNA (truncation at nucleotide 112) has previously been inserted in pSecTag2 for production of a soluble form of the enzyme (Turcot et al. 2003). COS cells were transfected with either the pSecTag2-GT6m5, the pSecTag2-GT6m6 or the pSecTag2-rat A enzyme vector using lipofectamineTM. After 48 h, the supernatant was collected and used as a crude enzyme preparation. The reaction mixtures contained 40 µl COS supernatant, 3 mM MnCl₂, sugar acceptor at a final concentration of 4.5 mM for free, methyl-, phenyl-, or benzyl-oligosaccharides or of 0.56 mM for biotinylated substrates, and either 20 µM UDP-D-[¹⁴C]-N-acetylgalactosamine (55 mCi/mmol, ICN, Costa Mesa, CA, USA) or 20 µM UDP-D-[¹⁴C]-galactose (278 mCi/mmol, NEN, Chemical center, Dreieichendain, Germany) as sugar donors, in a final volume of 50 µl, and were incubated at 37°C for 16 h. After incubation, the reaction mixture was quenched with 750 µl distilled water and applied to an AG1-X8 column, chloride form, 100-200 mesh (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) when free or methyl-oligosaccharides were used as acceptors or to a Sep-Pak C18 classic cartridge (Waters, Millipore) when benzyl-, phenyl-oligosaccharides, or biotinylated oligosaccharides were used. The radiolabeled products were then eluted with 1 ml water in the case of AG1-X8 columns or with 5 ml of methanol in the case of the Sep-Pak C18 classic cartridges and counted in 5 ml scintillation liquid (Ready SafeTM, Beckman, Palo Alto, CA). Background levels were obtained from controls without exogenous acceptor and from supernatants of mock-transfected COS cells. Values obtained for the controls were then subtracted from those obtained for the assays.

Quantitative real time PCR (Q-PCR)

The differential expression of the transcripts of GT6m5 and GT6m6 was confirmed and quantified in Q-PCR on an Mx4000 apparatus (Stratagene) using SYBRGREEN (Stratagene) DNA binding dye. The house keeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(Gapdh) was used as a reference for relative quantification and to ensure quality and efficiency of the PCR reaction. Primers were designed using the program (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 WWW.cgi>) and their sequences are given in Table 1. Each primer set showed a single peak in dissociation curves, indicating specificity. Additionally, a regular PCR was performed for each gene to control the size of amplicons. The Q-PCR mix contained 3 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTP, 50 or 100 nM of each primer (Gapdh or GT6m5 and GT6m6, respectively), 0.375 µl of reference dye, 2.5 µl of a 1/3000 SYBRGREEN dilution and 2.5 µl 10x buffer, in a total volume of 25 µl. The temperature cycles were as follows : 10 min at 95°C, 40 cycles (30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 68°C). Each reaction was performed in duplicates for all samples. Amplification efficiencies were 100% for Gapdh, 92% for GT6m5 and GT6m6. Standards were prepared from known copy numbers of Gapdh, GT6m5 and GT6m6 cDNAs inserted the pCR3.1 plasmid. Calculation of copy numbers was done from the standards and results expressed as percent GT6m5 or GT6m6 copies relative to Gapdh copies.

Table 1

	UDP-GalNAc	UDP-Gal
Free oligosaccharides		
Gal β 1,3GlcNAc	-	-
Gal β 1,4GlcNAc	-	-
Gal β 1,3GalNAc	-	ND
Gal β 1,4Glc	-	-
Gal β 1,4(Fuc α 1,2)Glc	-	-
Gal3GlcNAc3Gal4Glc	-	-
Fuc2Gal3GlcNAc3Gal4Glc	-	-
Methyl-oligosaccharides		
Gal β 1,3GlcNAc β 1-O-Me	-	-
Gal β 1,4GlcNAc β 1-O-Me	-	-
Biotinylated oligosaccharides		
Gal β 1,3GlcNAc β 1-sp-biot	-	ND
Gal β 1,3GalNAc α 1-sp-biot	-	-
Gal β 1,3GalNAc β 1-sp-biot	-	-
Gal β 1,4Glc β 1-sp-biot	ND	-
Fuc α 1,2Gal β 1,3GlcNAc β 1-sp-biot	-	-
Fuc α 1,2Gal β 1,4GlcNAc β 1-sp-biot	-	-
Fuc α 1,2Gal β 1,3GalNAc α 1-sp-biot	-	-
Gal β 1,3(Fuc α 1,4)GlcNAc β 1-sp-biot	ND	-
Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β 1-sp-biot	-	-
HSO ₃ Gal β 1,3GlcNAc-sp-biot	-	-
Gal α 1,4Gal β 1,4GlcNAc β -sp-biot	ND	-
Gal α 1,3Gal β -sp-biot	ND	-
Gal α 1,3(Gal α 1,4)Gal β 1,4GlcNAc β -sp-biot	ND	-
Gal α 1,3Gal β (Fuc α 1,2)-sp-biot	ND	-
Gal α 1,2Gal β -sp-biot	ND	-
Gal α 1,3GalNAc β -sp-biot	ND	-
α DGal-sp-biot	ND	-
Gal α 1,4GlcNAc-sp-biot	-	-
Gal α 1,3Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc β 1-sp-biot	ND	-
β Glc-sp-biot	-	-
β GlcNAc-sp-biot	-	-
GlcNAc β 1,4GlcNAc-sp-biot	-	-

Gal β 1,4GlcNAc β 1-biot	ND	-
GalNAc β 1,3GalNAc α -sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,4GlcNAc β -sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,6GalNAc α -sp-biot	ND	-
6-O-Su-GlcNAc β -sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,2Gal β 1,3GalNAc α -sp-biot	ND	-
6-LacNAc-Gal β 3GalNAc-sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,3(GlcNAc β 1,6)GalNAc α -sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,4(GlcNAc β 1,6)GalNAc α -sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc β -sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc β 1,4GlcNAc β -sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,3Gal β 1,3GalNAc α -sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,4GlcNAc β -Asn-biot	ND	-
GlcNAc β 1,6(Gal β 1,3)GalNAc α -sp-biot	ND	-
GlcNAc β 1,3(GlcNAc β 1,6)GlcNAc β 1,4GalNAc α -sp-biot	ND	-
Benzyl-oligosaccharides		
GalNAc α 1-Bz	ND	-
Gal β 1,4GlcNAc β 1-Bz	ND	-
Gal β 1,3GalNAc α 1-Bz	ND	-
Gal β 1,4Glc β 1-Bz	ND	-
Phenyl-oligosaccharides		
Gal β 1	ND	-
Fuc α	ND	-

Acceptor substrates tested for the determination of the enzyme activity of rat G α m5 and GT6m6. The acceptors were tested with either UDP-Gal or UDP-GalNAc as donor substrates. sp : O-(CH₂)₃-NH ; biot : biotin ; Bz : benzyl ; Ph : phenyl ; Me: methyl; - : no activity above background ; ND : not determined. In parallel transfections of COS cells with pSecTag2 rat enzyme A, using the same experimental conditions, UDP-GalNAc as a donor substrate and 0.56 mM Fuc α 1,2Gal β 1,3GlcNAc β 1-sp-biot as acceptor, from 8000 to 13,000 cpm specific activity were recovered according to individual experiments. Background values in absence of acceptor were around 500 cpm.

Table 2

	forward			reverse		
	sequence	localisation	Tm	sequence	localisation	Tm
GT6m5	TGAGTTGGGTCCTCTTCGGA	410-431	63°C	TCTGGTTCGCAGTCATCACG	552-572	63°C
GT6m6	TTACCACGCTGCTGTCTTTG	726-745	60°C	TAGTGGGTCGGTGGAGAAAG	863-884	60°C
Gapdh	CTGGAGAAACCTGCCAAGTAT	738-776	62°C	GGAATGGGAGTTGCTGTTG	852-870	63°C

Primers used for quantitative PCR of rat GT6m5, GT6m6 and Gapdh. The localisations on the coding determining regions are defined from the start codon of each cDNA.

Table 3

	GT6-m5	GT6-m6
Olfactory bulb	0,8	0,9
Lung	0,2	0,6
Kidney	0,3	0,4
Salivary gland	0,1	0,3
œsophagus	ND	ND
Stomach	ND	ND
Duodenum	ND	ND
Ileum	ND	ND
Jejunum	ND	ND
Caecum	ND	ND
Proximal colon	ND	ND
Distal colon	ND	0,1
Liver	ND	0,1
Lymph node	ND	0,1
Brain	ND	ND
Heart	ND	ND
Striated muscle	ND	ND
Ovaire	ND	ND
Skin	ND	ND
Spleen	ND	ND
Thymus	ND	ND
Seminal vesicle	ND	ND
Urinary blader	ND	ND

Quantitative analysis of GT6m5 and GT6m6 mRNA in rat tissues. Results are shown as percent mRNA copies relative to the number of Gapdh mRNA copies. ND : not detected.

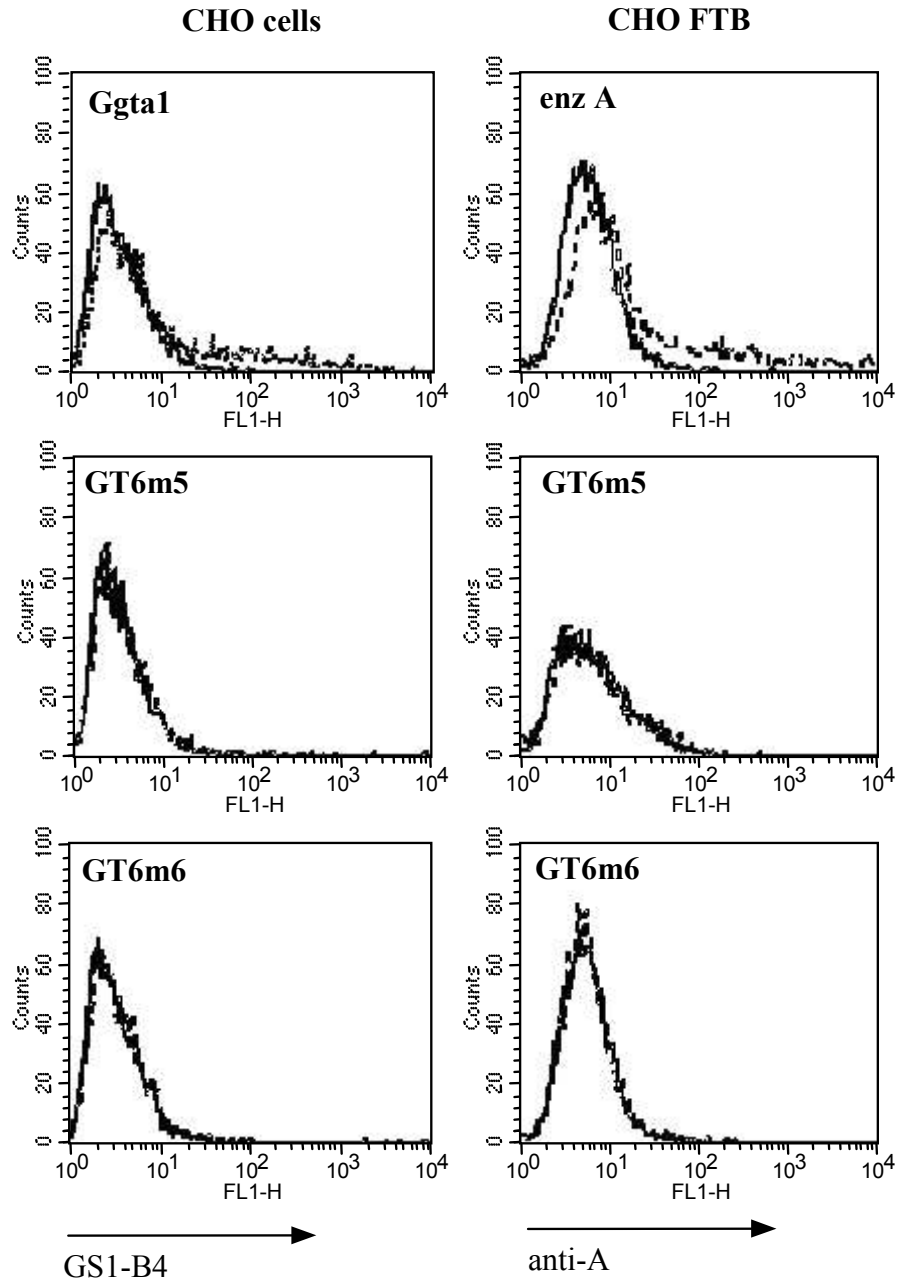


Figure 1 Expression of known structures of the ABO family at the surface of transfected CHO cells. CHO cells or CHO cells expressing α 1,2fucosylated structures after stable transfection with rat Fut2 cDNA (CHO-H) were respectively transfected with the rat Ggta1 cDNA or the rat enzyme A cDNA as positive controls (Ggta1, enzA). Additionnally, both types of cells were transfected with either the rat GT6m5 or GT6m6 cDNAs. 48h after transfection, cells were harvested and the α 3Gal antigen or the A antigen expressions were

tested by flow cytometry using either the GS1-B4 isolectin or an anti-A mAb. For each plot, a dotted line, which represents cells incubated with the lectin or the mAb, is superimposed on a plain line, which represents control cells incubated in PBS. A lack of change in reactivity, similar to those shown for GS-B4 and the anti-A, were obtained following transfection with GT6m5 and GT6m6 using the following mAbs and lectins : anti-Forssman, anti-P1, anti-P and anti-Pk, VVA, ECA, HPA, SJA and DBA. Antibodies and lectins were used at 10 µg/ml.

III- Conclusions

Quatre membres de la famille GT6 étaient identifiés avant notre étude :

- les glycosyltransférases A et B, dont le déterminisme enzymatique dépend du polymorphisme au niveau du locus *Abo*. La variation de l'expression de ces antigènes a été mise en évidence dans de nombreux cancers.
- l' α 1,3-galactosyltransférase, exprimée chez tous les mammifères exceptés les singes de l'ancien monde et les Hommes. L'antigène α 3 Gal est impliqué dans le rejet des xénogreffes.
- la Forssman synthase, permettant la synthèse d'un glycolipide qui serait reconnu par les Shiga toxines.
- l'iGb3 synthase, dont le rôle dans la synthèse du ligand endogène des NKTi sera discuté plus loin.

L'étude de cette famille chez le rat nous a permis d'identifier quatre nouveaux gènes : *Abo2*, *GT6m5*, *GT6m6* et *GT6m7*.

Le gène *Abo2* code pour une glycosyltransférase B fonctionnelle. Elle permet la synthèse de l'antigène B, quelque soit le phénotype dû au locus *Abo*. Par ailleurs, plusieurs gènes codant pour la glycosyltransférase A ont été identifiés chez le rat. Il semble donc qu'il y ait eu duplication du gène *Abo* dans cette espèce.

L'étude des gènes *GT6m5*, *GT6m6* et *GT6m7* n'a pas permis la mise en évidence d'une activité catalytique spécifique. Leur rôle *in vitro*, comme *in vivo* reste donc à démontrer. Cependant, l'absence du motif DVD sur les protéines GT6m5 et GT6m7 pose la question de la fonctionnalité de ces glycosyltransférases potentielles.

Le rôle d'un des membres de la famille GT6 va être présenté dans la deuxième partie de notre étude. En effet, notre équipe s'intéresse à la physiologie de lymphocytes non conventionnels : les NKT (Natural Killer T cells) à TCR invariant. Ces cellules sont activées en présence d' α galactosylcéramide issu d'une éponge marine. Une structure similaire est retrouvée chez les mammifères : le glycolipide iGb3 qui peut constituer un ligand endogène des cellules.

Les cellules NKTi (Natural Killer T) humaines sont impliquées dans l'immunité anti-tumorale naturelle. Elles sont activées par un antigène glycolipidique reconnu par un TCR V α 24V β 11 invariant. A ce jour, le ligand endogène de ces lymphocytes n'est pas connu. Néanmoins, les NKTi sont activés par un glycolipide purifié d'une éponge marine : l' α galactosylcéramide. Cette molécule ne peut pas être le ligand naturel des cellules NKTi humaines car les glucides greffés sur un groupement céramide chez les mammifères le sont toujours par une liaison de type β . Il semble donc qu'un glycolipide plus complexe soit le ligand endogène des NKTi humains.

En 2004, l'équipe de A. Bendelac a démontré que l'iGb3 est le ligand endogène des cellules NKTi murines (Zhou et al., 2004b). Dans cette même étude, la reconnaissance de l'iGb3 par les cellules NKTi humaines est mise en évidence, sans pour autant démontrer que l'iGb3 est le ligand naturel des NKTi humains. Si l'iGb3 est largement exprimé sur les tissus murins, sa présence n'a jamais été décrite dans des tissus humains et la fonctionnalité de l'iGb3 synthase humaine n'a jamais été démontrée. Au contraire, Taylor et Milland suggèrent l'inactivation de l'iGb3 synthase humaine suite à un problème lors de son épissage (Milland et al., 2006; Taylor et al., 2003).

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressée à la reconnaissance de cellules cibles humaines par des lymphocytes NKTi et à la possibilité que l'iGb3 soit l'antigène naturel des NKTi exprimé à la surface de ces cellules. Dans ce but, nous avons utilisé la lectine GS1-B4 comme marqueur putatif de l'iGb3. La recherche de l'antigène endogène des NKTi humains a été menée selon trois axes :

1 - Etude de l'expression de l'iGb3 dans les cellules tumorales et de leur interaction avec les NKTi : (a) identification de clones NKTi autoréactifs et non autoréactifs, (b) fixation de la lectine GS1-B4 sur les cellules tumorales, (c) amplification de l'ADNc de l'iGb3 synthase et inhibition de son expression par l'interférence à ARN, (d) recherche d'une relation entre la reconnaissance des cellules tumorales par les NKTi et le marquage par la GS1-B4.

2 - Etude des cellules dendritiques : interaction avec les NKTi, expression du ligand de la lectine GS1-B4 sur les cellules dendritiques et relation avec la réactivité des NKTi.

3 - Etude de la réactivité de cellules NKTi vis-à-vis de l'iGb3 purifié.

Matériel et Méthodes

I- Lignées cellulaires

D-Lignées établies

La lignée HeLa a été établie à partir d'un cancer de l'utérus chez une femme de 31 ans de groupe sanguin O, Henrietta Lacks, à Baltimore en 1951. Les cellules HeLa-CD1d nous ont été données par Mitchell Kronenberg (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA). Les cellules HEK293 ont été générées en 1977 par la transformation de cellules de rein embryonnaires (Human Embryonic Kidney) avec de l'ADN d'adénovirus 5 clivé. Les cellules HEK 293FT contiennent en plus l'épisme T et sont cultivées en milieu sélectif, contenant 0,3 mg/ml de néomycine. Toutes ces cellules adhérentes sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 1000 mg/l de glucose (BioWest) supplémenté de 10% Sérum de Veau Foetal (SVF; Eurobio) décomplémenté, 2 mM de L-glutamine (Invitrogen) et 1% de pénicilline / streptomycine (solution à 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine) (Invitrogen).

La lignée HD Mar a été établie à partir d'une effusion pleurale d'un patient ayant un lymphome de Hodgkin, et la lignée Namalwa et les transfectants Namalwa Gb3 #67 (données par Joëlle Wiels, CNRS, Villejuif) à partir d'un lymphome de Burkitt. Ces trois types cellulaires sont en suspension dans le milieu. Les cellules Wehi164, clone 13 sont issues des cellules adhérentes issues d'un fibrosarcome de souris Balb/C induit par injection sous cutanée de méthylchoranthrène. Ces cellules sont toutes cultivées dans un milieu RPMI 1640 (BioWest) supplémenté de 10% SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 1% de pénicilline / streptomycine (solution à 50 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine).

Toutes ces cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de dioxyde de carbone. Lorsqu'elles arrivent à confluence, les cellules adhérentes sont traitées avec de la trypsine : EDTA (1 : 250) (Sigma), sauf les cellules Wehi qui sont décollées par grattage. Elles sont ensuite repiquées dans du milieu complet. Les cellules en suspension sont directement repiquées dans du milieu complet. L'absence de contamination de ces cellules par des mycoplasmes est régulièrement testée par un marquage au réactif de Hoechst.

E- Cellules NKTi

Les lymphocytes NKTi ont été obtenus à partir de différents donneurs. Après purification sur un gradient de densité (Eurobio), les PBL (cellules du sang périphérique) sont incubés successivement avec un anticorps anti-V α 24 de souris (Beckman Coulter) dilué au 1/10 pendant 30 minutes à 4°C et avec des billes magnétiques Dynabeads M450 (Dyna) recouvertes d'anti-IgG de souris pendant 4 heures à 4°C, sous agitation. Ensuite, les cellules spécifiquement marquées par l'anticorps anti-V α 24 sont isolées par tri magnétique et stimulées en présence de leucoagglutinine L, comme décrit plus bas. Quand les cellules sont assez nombreuses, un second tri est réalisé dans les mêmes conditions en utilisant un anticorps dirigé contre la chaîne V β 11, ce qui permet l'amplification d'une population polyclonale de NKTi V α 24V β 11. Les clones NKTi sont ensuite obtenus par un clonage par dilution limite.

Les NKTi sont cultivés dans du RPMI 1640 supplémenté de 10% SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 1% de pénicilline / streptomycine (solution à 50 UI/ml de pénicilline et 50 μ g/ml de streptomycine), et 300 U/ml IL-2 (Chiron). Le milieu est régulièrement renouvelé mais jamais dans sa totalité, de façon à conserver les cytokines induites par les NKT. Les lymphocytes sont maintenus à une concentration d'environ 10⁶ cellules/ml.

Après décongélation, les lymphocytes sont stimulés en présence de PBL irradiés (monocytes / macrophages, lymphocytes B et T) et de lignées lymphocytaires B (LB) immortalisées irradiées issues de trois donneurs différents, avec de leucoagglutinine L (Sigma). Les PBL sont obtenus par purification sur gradient de densité de sang irradié à 75 Grays. Ils sont ensuite rincés dans du milieu RPMI, les plaquettes sont éliminées par centrifugation, et les PBL sont remis en suspension dans du milieu RPMI supplémenté de 2 mM de L-glutamine, 1% de pénicilline / streptomycine, 300 U/ml IL2, et 8% de sérum humain, à une concentration de 10⁷ cellules/ml. Les LB immortalisés sont irradiés à 75 Grays et remis en suspension dans un milieu identique à celui utilisé pour les PBL à une concentration de 10⁶ cellules/ml. Pour stimuler 10⁶ lymphocytes NKT, on utilise 10⁷ PBL irradiés, 10⁶ LB irradiés, 1 μ g/ml leucoagglutinine L dans un volume total de 15ml de RPMI supplémenté de 2 mM de L-glutamine, 1% de pénicilline / streptomycine, 300 U/ml IL-2, et

8% de sérum humain. Les cellules sont réparties dans une plaque 96 puits, à raison de 150 µl/puits, et incubées 7 à 10 jours dans l'étuve à 37°C. Passé ce délai, les cellules stimulées forment des culots au fond des puits. Elles sont alors transférées dans une flasque F75 et entretenues comme décrit précédemment.

F- Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont issues de la différenciation de monocytes adhérents, en présence de cytokines spécifiques. Il est donc nécessaire d'utiliser de grandes quantités de monocytes. C'est pourquoi les PBMC utilisés dans ce but sont purifiés non pas à partir de sang total, comme pour la stimulation des lymphocytes NK_{Ti}, mais à partir de résidus de couches leucoplaquettaires plus concentré en PBMC. Les PBMC sont purifiés sur un gradient de densité, rincés dans du milieu RPMI, et mis en suspension dans du SVF, avant d'être congelés dans du SVF contenant 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma), à une concentration de $20 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les cellules sont conservées à -80°C pendant au moins 48 heures, puis stockées dans l'azote liquide.

Pour la production de DC, les PBMC sont mis en suspension dans du milieu RPMI 1640 supplémenté de 2 mM de L-glutamine, de 1% de pénicilline / streptomycine, et de 5% de SVF décomplémenté, à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml. Ils sont déposés dans une boîte de culture et incubés pendant 90 minutes à 37°C, pour permettre l'adhérence des monocytes. Ensuite, cinq rinçages avec du PBS 1X des cellules adhérentes sont réalisés, avant d'ajouter du milieu de culture des DC (décrit ci-dessus), complémenté avec 0,1 µg/ml d'interleukine 4 (IL4) (Abcys) et 0,05 µg/ml de GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) (Abcys). Après 2 jours, on ajoute de l'IL-4 et du GM-CSF aux mêmes concentrations. Après 5 jours, on obtient des DC immatures (DC_i). Après avoir ajouté 0,05 µg/ml d'IL-4 et 0,025 µg/ml de GM-CSF, une partie des DC_i est prélevée pour permettre la différenciation en DC mature (DC_m). Dans ce but, les cellules sont mises en suspension dans le milieu induit à une concentration de $0,5 \cdot 10^6$ cellules/ml. L'ajout de 1 µg/ml de lipopolysaccharide (LPS) purifié de *Salmonella typhosa* (Sigma) et de 10 ng/ml de TNF-α (Tumor Necrosis Factor) (Abcys) dans le milieu permet la maturation des DC en 48 heures. La maturation est contrôlée par un marquage des DC_i et DC_m avec des anticorps dirigés contre des marqueurs de différenciation (CD) spécifiques des DC_m, couplés soit au FITC soit

à de la phycoérythrine (PE) : CD80-PE, CD83-FITC (Immunotech) et CD86-PE (Beckman Coulter). La fixation non spécifique des anticorps est contrôlée par l'utilisation d'isotypes IgG. Après incubation de 150 000 DC avec les anticorps dilués au 1/10 dans du PBS 0,1% gélatine pendant 15 minutes à 4°C à l'obscurité, les cellules sont analysées par cytométrie en flux sur un FACScalibur (Beckton-Dickinson) avec le logiciel CellQuest Pro.

Les produits sanguins (sang et résidus de couches leucoplaquettaires) utilisés dans notre laboratoire nous sont fournis par l'établissement français du sang (EFS).

II- Analyses par cytométrie en flux

C- Marquage des cellules

L'analyse des caractéristiques phénotypiques des cellules se fait par cytométrie en flux. 250 000 cellules sont incubées avec l'anticorps ou la lectine à la dilution adéquate dans du PBS 1X contenant 0,1% de gélatine, dans un volume total de 25 µl, pendant 15 minutes à 4°C. Ensuite, les cellules sont lavées trois fois. Si les anticorps primaires ne sont pas couplés à un fluorochrome, les cellules sont incubées soit avec l'anticorps secondaire soit avec l'extravidine couplés à un fluorochrome. Après une seconde incubation dans les mêmes conditions que la première, les cellules sont lavées trois fois et analysées sur le FACScalibur. Les anticorps, lectines et réactifs utilisés lors de ces études sont listés dans le Tableau 10.

Anticorps / Lectine	Concentration	Fournisseur
GS1-B4-biot	10 µg/ml	Vector laboratories
1A4 (souris)	1/300	donné par J. Wiels, ascite, IgM de souris
anti-CD90 PerCP	1/10	Beckman Coulter
anti-CD1d 51.1 (souris)	17 µg/ml	donné par S. Porcelli
anti-souris FITC (Fab spécifique)	49 µg/ml	Sigma
extravidine FITC	1/200	Sigma
extravidine PE	1/40	Sigma
anti-V α 24-FITC (souris)	1/10	Beckman Coulter
anti-V β 11-PE (souris)	1/10	Beckman Coulter

Tableau 10 : Anticorps, lectines et réactifs utilisés pour les analyses par cytométrie en flux.

D-Inhibition de la fixation de GS1-B4 avec du Gal libre

250 000 cellules HeLa-CD1d sont incubées pendant 40 minutes à 4°C avec la lectine GS1-B4 en présence ou non de galactose ou de glucose libre. La lectine est à une concentration de 10 µg/ml et les glucides libres sont utilisés à 500 mM dans un volume total de 50 µl de PBS 1X contenant 0,1% de gélatine. Cette concentration de galactose libre permet d'inhiber une fixation spécifique de la lectine GS1-B4 (donnée indiquée par Vector Laboratory). Après l'incubation, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X 0,1% gélatine et incubées 40 minutes avec l'extravidine-FITC (Sigma) diluée au 1/200. Après trois lavages, le marquage membranaire des HeLa-CD1d est analysé par cytométrie en flux.

Pour l'étude des DC, un protocole différent est utilisé. La lectine GS1-B4 est co-incubée avec du Gal ou du Glc 300 mM, avant d'être mise en contact avec les cellules DC pendant 15 minutes. Les DC sont fragiles et ne supporteraient pas une incubation de 40 minutes à 4°C.

III- Clivage des galactoses terminaux sur les cellules

La spécificité du marquage des résidus Gal terminaux par la lectine GS1-B4 sur les cellules HeLa CD1d sera étudiée avec deux α galactosidases différentes :

- α galactosidase extraite de grains de café vert (Sigma), 50 unités/ml.
- α 3,6 galactosidase recombinantes produite dans *Escherichia coli* (Sigma), 410 unités/ml.

$1,25 \cdot 10^6$ cellules HeLa CD1d sont ensemencées dans une plaque 12 puits avec 250 μ l de milieu de culture et incubées à 37°C pendant 1 heure pour permettre leur adhérence. Ensuite, le milieu de culture est délicatement retiré et remplacé par 500 μ l de tampon cacodylate 50mM, pH 6,5 plus ou moins l' α ou l' α 3,6 galactosidase à la concentration finale de 3 U/ml. Les cellules sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Ensuite, le tampon cacodylate est transféré dans un tube, dans le cas où quelques cellules seraient en suspension. Les cellules sont décollées du puits avec de la trypsine : EDTA et ajoutées au tampon cacodylate déjà présent dans le tube, pour être ensuite centrifugées, remises en suspension dans du PBS 1X 0,1% gélatine, et analysées en cytométrie en flux après incubation avec la lectine GS1-B4 selon les conditions habituelles.

IV- Inhibition de la synthèse des glycolipides

L'inhibition de la synthèse des glycolipides dans les cellules en présence de PPMP (D,L-thréo-1-phényl-2-hexadécanolamino-3-morpholino-1-propanol) (Sigma) est réalisée selon le protocole décrit par Yowler et ses collaborateurs (Yowler et al., 2002).

10^6 cellules sont incubées à 37°C dans 10 ml de milieu de culture en présence de PPMP à une concentration finale de 7,5 μ M. Après 48 heures, le milieu de culture + PPMP est remplacé par du DMEM sans sérum, ni glutamine, ni pénicilline / streptomycine pendant 24 heures. Ensuite, les cellules sont analysées en cytométrie en flux comme décrit précédemment.

V- Tests fonctionnels

Ces tests permettent d'évaluer la réponse des cellules NKT après leur incubation avec des cellules cibles.

La veille des tests fonctionnels, les cellules sont incubées avec le glycolipide à la concentration adéquate, afin qu'il soit chargé sur les molécules CD1d exprimées à la surface de ces cellules.

Mis à part le KRN7000, déjà solubilisé dans du DMSO, les glycolipides sont réceptionnés sous leur forme solide. Ils sont donc mis en suspension dans du DMSO, et solubilisés par deux incubations successives : la première de 10 minutes à 56°C, et la seconde d'au moins une heure à 37°C. Ils sont ensuite mis au contact des cellules cibles à la concentration adéquate, pendant une nuit à 37°C. Les cellules cibles non chargées avec le glycolipide sont préparées dans les mêmes conditions mais incubées avec du DMSO seul.

Après l'incubation, les cellules sont lavées trois fois dans du milieu de culture afin d'éliminer l'excès de glycolipide présent dans le surnageant.

C- Test de cytotoxicité à médiation cellulaire

Le test de cytotoxicité à médiation cellulaire permet d'évaluer la capacité des lymphocytes NKT à lyser une cellule cible. Les cellules cibles incorporent du ^{51}Cr et le dosage de la quantité de radionucléide relargué permet de mesurer la lyse cellulaire.

Après élimination de l'excès de glycolipide, les cellules cibles sont incubées pendant 1 heure avec du chrome 51 (^{51}Cr), qu'elles vont incorporer. Le ^{51}Cr est utilisé en excès à une concentration de 5 μCi pour 10^6 cellules. Ensuite, les cellules sont lavées 3 fois et réparties dans une plaque 96 puits à raison de 3 000 cellules/puits dans un volume total de 50 μl . Le relargage spontané (SR) de ^{51}Cr est mesuré par l'incubation des cellules cibles dans 50 μl de milieu de culture seul, tandis que le relargage maximum est mesuré par leur incubation dans 50 μl Triton X100 1%.

Les cellules effectrices (lymphocytes NKT) sont lavées trois fois dans du milieu RPMI afin d'éliminer toute trace d'IL-2, et réparties dans la plaque 96 puits sur les cellules cibles. Trois rapports effecteurs:cibles sont testés : 30:1 ; 10:1 ; et 1:1. La capacité de lyse des NKTi est vérifiée par leur incubation avec du phorbol-12-myristate-13-acétate

(PMA) (Sigma) et de la ionomycine (Sigma). Cela permet l'activation non spécifique des NKTi et la lyse des cellules cibles, qu'elles soient ou non naturellement reconnues.

Chaque condition est testée en triplicate, sauf les contrôles de relargage spontané ou maximum qui sont testés dans 6 puits. Les cellules sont incubées pendant 4 heures à 37°C.

Ensuite, les cellules sont culotées et 25 µl de surnageant est transféré dans une plaque 96 puits flexible. Après avoir ajouté 100 µl de liquide scintillant dans chaque puits, la radioactivité est mesurée sur un compteur de radioactivité β (Perkin Elmer).

Le calcul de la radioactivité spécifique est réalisé comme suit :

$$\% \text{ cytotoxicité} = [(LT-SR)/(MR-SR)] \times 100$$

LT : moyenne des valeurs obtenues dans chaque puits en triplicate.

SR : moyenne des valeurs obtenues pour chacun des 6 puits en présence de SVF.

MR : moyenne des valeurs obtenues pour chacun des 6 puits en présence de 1% Triton X100.

D-Test de la production de cytokines par les NKTi

1- Production de cytokines dans le surnageant par les NKTi

Après élimination de l'excès de glycolipide, les cellules cibles sont réparties dans une plaque 96 puits, à raison de 30 000 cellules/puits. En parallèle, les NKTi sont lavés 2 fois dans du milieu sans IL-2, et répartis sur les cellules cibles (15 000 NKTi par puits). Après une centrifugation, qui permet de culoter les NKTi sur les cellules cibles, le milieu est remplacé par 100 ou 150 µl/puits de milieu de culture, pour les dosages du TNF-α ou de l'IL-4 et de l'IFN-γ, respectivement.

Après 6 heures d'incubation à 37°C, les surnageants sont récupérés et centrifugés pour éliminer les éventuels débris cellulaires. Ensuite, ils sont stockés à -80°C en attendant le dosage des cytokines.

2- Dosage du TNF-α

Le dosage de TNF-α utilise une propriété des cellules Wehi164, clone 13 qui sont sensibles à cette cytokine sous certaines conditions (Espevik and Nissen-Meyer, 1986).

La veille du test, les cellules Wehi164, clone 13 sont diluées car elles doivent être en expansion lors du test (sinon, on observe une diminution de leur sensibilité au TNF- α). Le premier jour, les cellules Wehi164, clone 13 sont mises en suspension dans du milieu de culture additionné d'actinomycine D (2ng/ μ l) (Sigma) et de chlorure de lithium (40 mM) et réparties dans une plaque 96 puits (30 000 cellules/puits), dans un volume total de 50 μ l. Ensuite, on ajoute soit les surnageants testés précédemment soit du TNF- α à une concentration variant de 800 à 12,5 pg/ml de façon à établir une gamme (dilution en cascade de deux en deux). Les cellules sont incubées dans ces conditions pendant une nuit, à 37°C. Le deuxième jour, 50 μ l de méthylthiazoletétrazolium (MTT) à 2,5 mg/ml (Sigma) sont ajoutés aux cellules. Seules les cellules vivantes permettent la cristallisation du MTT. Après 3-4 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont lysées avec 100 μ l de tampon contenant du 33% de DMSO et de 5% de sodium dodécyl sulfate, et conservées à température ambiante à l'obscurité, jusqu'à la lyse complète des cellules. La révélation du test se fait le lendemain par la lecture des densités optiques à une longueur d'onde de 470 nm.

3- Dosage de l'IL-4 et de l'IFN- γ

La quantité d'IL-4 et d'IFN- γ dans les surnageants est dosée par un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), avec les kits respectifs BD OptiEIA Human IL-4 ELISA Set et BD OptEIA Human IFN- γ ELISA Set (BD Biosciences). Les tests sont réalisés selon les instructions du fournisseur. Les lavages sont toujours réalisés avec 250 μ l de PBS 1X contenant 0,05% tween 20, et toutes les incubations se font à température ambiante sauf pour la fixation du premier anticorps.

La veille du test, 100 μ l d'anticorps (anti-IL4 humain ou anti-IFN- γ humain) à une dilution de 1/250 dans du tampon carbonate / bicarbonate 0,1 mM à pH 9,5 sont déposés dans les puits des plaques MaxiSorp (Nunc), et incubés en chambre humide à 4°C pendant la nuit. Après trois rinçages, les puits sont saturés avec 200 μ l de PBS 1X contenant 10% de SVF, pendant 2 heures. Les puits sont ensuite lavés et les échantillons déposés. Par puits, on dépose 60 μ l d'échantillon ou 100 μ l de chaque point de gamme. Les gammes se situent entre 500 et 7,8 pg/ml pour l'IL4 et entre 300 et 4,7 pg/ml pour l'IFN- γ . Elles sont préparées par des dilutions en cascade de cytokine recombinante dans du PBS 1X 10% SVF. Après 2 heures, les puits sont lavés 5 fois et incubés avec le réactif de détection. Il se compose du deuxième anticorps biotinylé (anti-IL-4 humain biotine utilisé à 1/500 ou anti-IFN- γ humain biotine

utilisé à 1/250) et d'avidine HRP, diluée au 1/250. Après 1 heure, les puits sont lavés 7 fois. Lors des 3 derniers rinçages, le PBS 1X 0,05% tween 20 est incubé 1 minute dans les puits. Le test est révélé par l'addition de 100 µl/puits de TMB Ready to Use (BD). Après 30 minutes à l'obscurité, la réaction est arrêtée par l'addition de 50 µl/puits d'acide phosphorique 1M. Les résultats sont obtenus par la lecture des densités optiques à la longueur d'onde de 450 nm

VI- Immunohistochimie

La fixation de la lectine GS1-B4 est contrôlée sur des coupes de tissus tumoraux fixées en paraffine et congelées. L'ensemble des étapes du marquage est réalisé à température ambiante, sauf la fixation de la lectine qui se fait à 37°C.

Les premières étapes sont spécifiques des coupes fixées en paraffine. En effet, deux incubations successives, de 10 minutes dans du LMR1 puis du LMR2, permettent le déparaffinage de la coupe. Ensuite, elle est réhydratée par des bains successifs de 2 minutes dans de l'éthanol 100%, 90%, 70%, et 50%. Enfin, les coupes sont rincées dans du PBS 1X.

Par la suite, le marquage des coupes suit le même protocole que le tissu soit fixé ou congelé. La peroxydase endogène est inhibée par une incubation de 20 minutes à l'obscurité dans du PBS 1X contenant 0,3% H₂O₂. Après deux lavages, les sites non spécifiques sont saturés par du PBS 1X contenant 3% de BSA, pendant 30 minutes. Ensuite, les coupes sont incubées 2 heures à 37°C avec la lectine GS1-B4-peroxydase (Vector laboratories), utilisée à 40 µg/ml, dans du PBS 1X 1% BSA. Après 3 lavages, le marquage est révélé avec le Kit AEC (Vector laboratories) utilisé dans les conditions indiquées par le fournisseur, pendant 15 minutes à l'obscurité. La contre coloration des coupes est réalisée à l'hématoxyline pendant quelques secondes. Les coupes sont ensuite rincées à l'eau distillée, et montées sur lame en Aquatex (Merck).

VII- Etude de l'iGb3 synthase humaine

D-Préparation de l'ADNc

L'extraction de l'ARN est réalisée avec le kit « SV Total RNA Isolation System » (Promega). La quantité de cellules utilisées pour l'extraction est adaptée en fonction du type

cellulaire : 5.10^6 cellules pour les HeLa, HEK et lymphocyte (V β 5.2) ; 7.10^6 pour les DCi et DCm ; et 10.10^6 pour les HD Mar. Les cellules sont lavées dans du PBS 1X stérile froid, avant d'être mises en suspension dans le tampon de lyse. A cette étape, l'ADN génomique est cassé par le passage des cellules dans une aiguille. L'ARN est ensuite extrait selon les indications du fournisseur. La concentration et l'absence de contamination protéique de l'ARN sont déterminées respectivement par la mesure de la densité optique à 260 nm et par le rapport entre la densité optique à 260 et celle à 280.

Le mélange réactionnel de la transcription inverse (RT) se compose de 0,5 mM de dNTP, 10 mM de DTT, 0,5 μ M d'un mélange d'hexamères, du milieu tampon et de l'ARN, dans un volume total de 20 μ l. Après 5 minutes d'incubation à 70°C, 40 unités de RNasin (Promega) et 200 unités de transcriptase inverse M-MLV (Promega) sont ajoutées. La réaction se déroule pendant 1 heure à 42°C, et est arrêtée par une incubation de 5 minutes à 70°C. A la fin de la réaction, 30 μ l d'eau ont ajoutés et l'ADNc obtenu est conservé à -80°C. La quantité d'ARN varie selon les types cellulaires, et est présentée dans le tableau 11.

Cellules	Quantité d'ARN (μ g/ml)
DCi	1
DCm	1
HD Mar	0,74
HEK293 CD1d	1
HeLa	1
HeLa CD1d	1
Lymphocytes	0,5

Tableau 11 : Quantité d'ARN utilisé pour les RT-PCR, en fonction du type cellulaire

La contamination de l'ADNc par de l'ADN génomique (ADNg) et sa qualité sont contrôlées par une PCR avec des amorces spécifiques de la β 2 microglobuline humaine. Elles sont situées sur deux exons différents, et permettent donc de discriminer l'ADNc par rapport l'ADNg. Selon la contamination ou non par de l'ADNg, la PCR permet l'amplification de séquences respectives de 725 pb ou 109 pb.

E- Détection de l'iGb3 synthase humaine dans les lignées

La présence de l'ADNc de l'iGb3 synthase dans les lignées HD-Mar, HeLa, HEK293, Namalwa et dans les cellules dendritiques immatures et matures est déterminée par PCR, en utilisant les amorces hiGb3-11s et hiGb3-13as (voir tableau 12). L'efficacité des amorces n'a pas pu être contrôlée car l'expression de l'iGb3 synthase chez l'Homme n'est pas documentée. Le mélange réactionnel se compose des amorces spécifiques, à une concentration de 4 μ M, 0,2 mM de dNTP, 1 μ l de Taq Advantage-GC 2 Polymérase Mix (Clontech), 5 μ l du produit de la RT-PCR et du tampon de réaction, dans un volume total de 50 μ l. La polymérase utilisée est spécialement conçue pour amplifier des séquences riches en nucléotides G et C. La PCR se déroule comme suit : dénaturation initiale à 98°C pendant 3 minutes, suivie de 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 65°C et 1 minute à 68°C. Les produits de la PCR sont ensuite analysés par migration sur gel d'agarose 1%, contenant du bromure d'éthidium (BET), un intercalant de l'ADN, utilisé à 50 ng/ml.

F- Amplifications des exons de l'iGb3 synthase

L'amplification de fragments exoniques de l'ADNc de l'iGb3 synthase est réalisée par PCR pour contrôler l'épissage correct de l'ARN messager. Afin d'éviter toute contamination génomique, on utilise de l'ADNc de testicule humain commercialisé (Clontech). Dans le testicule, une fuite transcriptionnelle a été observée, ce qui permet l'expression de nombreux ARNm peu ou pas exprimés dans les autres tissus. Le mélange réactionnel de la PCR se compose de 2 μ M de chaque amorce (sens et inversée), 200 μ M de dNTP, 1 μ l de Taq Advantage-GC 2 Polymérase Mix (Clontech), 2,5 μ l d'ADNc de testicule humain, du tampon de réaction, dans un volume total de 50 μ l. La PCR se déroule comme suit : dénaturation initiale à 98°C pendant 3 minutes, suivie de 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 65°C et 1 minute à 68°C. Les produits de la PCR sont ensuite analysés par migration sur gel d'agarose 1%, contenant 50 ng/ml de BET.

L'ensemble des amorces utilisées est présenté dans le tableau 12.

Amorce	Séquence (5' → 3')	Position	T _m (°C)
hiGb3-11	GTTCTGCATGGACGTGGACCAG	585	57°C
hiGb3-13as	CTAGTTCCGCAGCAGCCGGTACCCCTT	997/1023	70°C
hiGb3-14s	ATGGCTCTCAAGGAGGGACTCAGGGCCTGGAA	1/32	71°C
hiGb3-16as	TGCTGTCTAGCCTCTTGCTTGGCC	273/297	65°C
hiGb3-18as	GACATTGTGGCCGAAGGGCAGAC	135/158	66°C
hiGb3-19s	GCCTGTTTCTGTATGGCCTCCCTAA	77/102	64°C
hiGb3-20as	TTAGGGAGGCCATACAGAAACAGGC	77/102	64°C
β2m-1s	TTCACCCACGAAAAAGATGA	268/290	56°C
β2m-2as	ACCTCCATGATGCTGATTACA	356/+16	56°C

Tableau 12 : Liste des amorces utilisées dans les réactions de PCR. Les ADNc de l'iGb3 synthase humaine et de la β2microglobuline humaine sont respectivement de 1023 pb et 360 pb.

VII- L'interférence à ARN

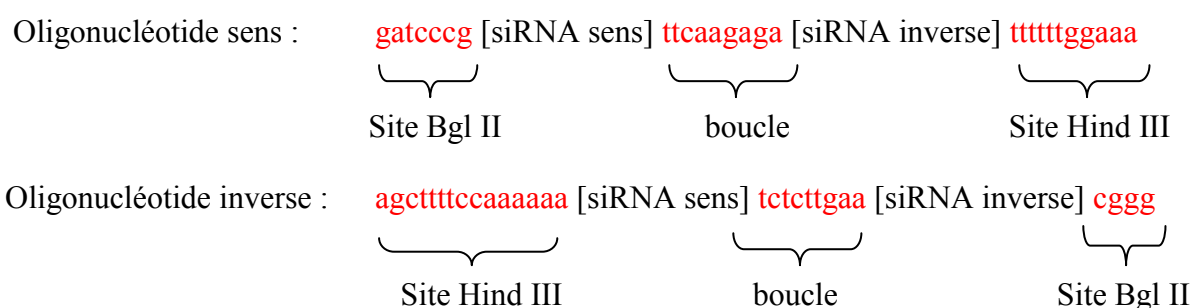
E- Préparation des siRNA

Trois petits ARN d'interférence (siRNA) seront testés pour l'ADNc de l'iGb3 synthase et deux pour la glucosylcéramide synthase. Les oligonucléotides les plus susceptibles d'interférer avec l'ARN messager ont été sélectionnés à l'aide d'un logiciel disponible sur le site : <http://rnaidesigner.invitrogen.com/sirna/>. Plusieurs siRNA sont édités en respectant une taille de 19 bases et un pourcentage en G et C de 35% à 55%. Parmi ces siRNA, on sélectionne les quatre répondant le plus fidèlement aux critères suivant : présence d'un A en position 3 et 19, présence d'un T en position 10, absence d'un G en position 13, absence d'un G ou C en position 19, au moins trois A ou T aux positions 15 à 19. Les siRNA choisis sont présentés dans le tableau 13.

siRNA	Séquence
iGb3 synthase	
iGb3s-305	CCATTGGGCTGACTATCTT
iGb3s-332	GCAGATACCTGGAGAAGTA
Glucosylcéramide synthase	
gcs-678	CCAGGATATGAAGTTGCAA
gcs-874	GATACTATATCTCTGCCAA
gcs-1357	GCGAATCCATGACAATATA

Tableau 13 : Petits ARN d'interférence dirigés contre les ARN messagers de l'iGb3 synthase et de la glucosylcéramide synthase. Seuls les siRNA sens sont présentés.

Le vecteur utilisé pour la production de siRNA est le plasmide pSuper (Brummelkamp et al., 2002). Pour faciliter leur utilisation par la suite, les oligonucléotides sélectionnés sont insérés dans une séquence plus longue, permettant leur hybridation et le clonage dans le vecteur pSuper. Les oligonucléotides commandés chez Sigma genosys ont la structure suivante :



Les oligonucléotides sens et inverses sont hybridés. 4 µg d'oligonucléotide sens et 4 µg d'oligonucléotide inverse sont incubés avec le tampon n°2 (BioLabs) utilisé lors des digestions enzymatiques pendant 10 minutes à 94°C, suivies de 1h20 à 70°C au bain-marie. Après l'incubation, l'eau du bain-marie est prélevée dans un bécher que l'on entoure de glace afin qu'elle refroidisse progressivement jusqu'à atteindre environ 20°C. Cette étape permet l'hybridation lente des oligonucléotides.

Après hybridation, les oligonucléotides sont insérés dans le vecteur pSuper, préalablement ouvert par une digestion enzymatique avec Hind III et Bgl II (Promega). 300 ng d'oligonucléotides sont mis au contact de 100 ng de vecteur et incubés pendant 48 heures à 4°C, en présence de 1 unité de ligase (Invitrogen) dans son tampon réactionnel. Avant la transformation des bactéries, le produit de ligation est digéré avec l'enzyme Bgl II. L'insertion de l'oligonucléotide dans le plasmide pSuper détruit le site de restriction reconnu par Bgl II ; seuls les plasmides pSuper vide seront linéarisés, ce qui améliore l'efficacité de la transformation bactérienne par les plasmides ayant inséré le nucléotide. Les bactéries TOP10 (produites dans notre laboratoire) sont transformées par électroporation avec 1 µl du produit de la digestion, et étalées sur du LB-Agar contenant de l'ampicilline à une concentration de 100 µg/ml (antibiotique de sélection du plasmide pSuper). Après 24 heures, chaque colonie est ensemencée dans 5 ml de milieu 2XTY pendant 24 heures, à 37°C sous agitation. L'ADN bactérien est ensuite purifié et digéré avec les enzymes de restriction EcoR I (Promega) et Hind III pour contrôler la présence de l'oligonucléotide dans pSuper. La migration des produits de digestion sur un gel de 4% d'agarose permet de discriminer des séquences d'ADN présentant seulement 60 bases de différence. Les colonies ayant inséré le plasmide avec insert sont amplifiées dans du milieu 2XTY et l'ADN plasmidique est purifié avec le kit Qiaprep spin miniprep (Qiagen).

F- Contrôle de l'efficacité des siRNA

L'efficacité d'interférence des siRNA peut être contrôlée de deux façons. La première méthode est la transfection transitoire de cellules exprimant l'antigène cible (dans notre cas, les cellules HEK) avec le plasmide pSuper contenant le siRNA. Les cellules HEK293 sont cultivées dans des boîtes de Pétri 10 cm (Falcon). Quand elles sont à 90% de confluence, elles sont transfectées avec 20 µg d'ADN plasmidique en suspension dans 500 µl de tampon Hepes contenant 6,25 µM de CaCl₂, dans 10 ml de milieu de culture (transfection au phosphate de calcium). Après 6 heures, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS 1X, et 10 ml de milieu de culture est ajouté. 48 heures après la transfection, les cellules sont analysées par cytométrie en flux avec la lectine GS1-B4 biotinylée.

Un autre moyen de contrôler l'efficacité des siRNA est la mesure de l'activité luciférase après transfection dans les cellules HEK d'un gène de fusion entre la luciférase et le

gène cible des siRNA. Cette technique a été utilisée pour les siRNA ciblant la glucosylcéramide synthase (GCS). Dans un premier temps, l'ADNc de la GCS est sous cloné dans le plasmide pGL3 control vector linker (Promega, modifié par R. Breatnach, INSERM U601, Nantes), par digestion du plasmide pcDNA3.1+-GCS avec l'enzyme de restriction EcoR I suivie d'une ligation de l'insert GCS dans pGL3, dans les mêmes conditions que ci-dessus. Les bactéries TOP10 sont ensuite transformées avec le produit de la ligation, puis cultivées et amplifiées en milieu liquide, comme décrit précédemment. Enfin, l'ADN plasmidique est purifié avec le kit Qiaprep spin miniprep (Qiagen).

Les cellules HEK293 sont ensuite transfectées avec 20 µg d'ADN en suspension dans du tampon Hepes contenant 6,25 µM de CaCl₂, ajouté à 10 ml de milieu de culture. Six plasmides différents sont transfectés :

- pRLTK (Promega) : plasmide contenant l'ADNc de la luciférase de renilla
- pSHAG-Ff1 (Promega): plasmide contenant un siRNA dirigé contre la luciférase de Firefly
- pGL3 : plasmide contenant l'ADNc de la luciférase de firefly
- pGL3-GCS : plasmide contenant le gène de fusion entre la luciférase de firefly et la GCS
- pSuper : ne contient aucun gène
- pSuper-siRNA : plasmide contenant un siRNA dirigé contre la GCS

La transfection avec le plasmide codant pour la luciférase de renilla, pRLTK, permet de standardiser la production de la luciférase de firefly. L'activité minimale de la luciférase de firefly sera obtenue par la co-transfection de pSHAG-Ff1 avec le plasmide pGL3 et l'activité maximale par celle de pGL3 avec pSuper.

Les transfections avec les différents plasmides sont détaillées dans le tableau. Chaque transfection est réalisée en duplicates (Tableau 14).

	Quantité d'ADN transfecté		
	1 µg	18 µg	1 µg
Luci+	pRLTK	pGL3	pSuper
Luci-	pRLTK	pGL3	pSHAG-Ff1
Luci-GCS+	pRLTK	pGL3-GCS	pSuper
Luci-GCS-	pRLTK	pGL3-GCS	pSHAG-Ff1
GCS-678	pRLTK	pGL3-GCS	pSuper-gcs678
GCS-874	pRLTK	pGL3-GCS	pSuper-gcs874
GCS-1357	pRLTK	pGL3-GCS	pSuper-gcs1357

Tableau 14 : Conditions de transfections des cellules HEK 293 FT avec les différents plasmides.

48 heures après la transfection, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est mesurée avec le kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) selon les indications du fournisseur. Les résultats de ce test sont présentés sous la forme d'un pourcentage d'inhibition calculé comme suit :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{activité luciférase firefly}) / (\text{activité luciférase renilla}) \times 100$$

G-Production de lentivirus

Après contrôle de l'efficacité des siRNA, on produit des particules lentivirales siRNA. Pour ce faire, le plasmide pSuper-siRNA est digéré par les enzymes Spe I (Biolabs) et Sal I (Promega), ce qui permet d'isoler le siRNA associé à une séquence H1, permettant la synthèse des siRNA dans les cellules cibles. Cette cassette H1-siRNA est insérée dans le vecteur plentiThy1-Cla (Invitrogen) ouvert par digestion avec Sal I et Nhe I (Biolabs) (les sites de restriction de Nhe I et Spe I sont compatibles). Les bactéries TOP 10 sont transformées avec le produit de ligation par électroporation et amplifiées, l'ADN est purifié comme décrit précédemment. L'insertion correcte de la cassette est vérifiée par une digestion enzymatique.

L'obtention du plasmide plentiThy1-Cla contenant l'insert siRNA permet la production de particules virales. Trois millions de cellules HEK293FT sontensemencées dans une boîte de Pétri de 10 cm. Ces cellules contiennent l'épisome T et semblent plus efficaces pour la production virale. Le lendemain, les cellules sont transfectées au phosphate de

calcium avec quatre plasmides : plp1, plp2, plp-VSVG, et plenti Thy1-Cla-siRNA. Les trois premiers plasmides apportent les éléments nécessaires à la production des particules lentivirales. 4 µg de chaque plasmide sont transfectés dans les cellules. Chaque transfection est réalisée en triplicates. Après 6 heures en présence des plasmides, du CaCl₂ et du tampon Hepes, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS 1X, puis incubées pendant 48 heures dans du milieu de culture. Les particules lentivirales seront produites dans le surnageant. Après cette incubation, les surnageants de culture sont récupérés, les triplicates sont regroupés et passés sur filtre 45 µm. Toutes ces étapes sont réalisées sur de la glace car les particules virales sont très sensibles à la chaleur. Ensuite, les surnageants subissent une ultracentrifugation d'1h30 à 4°C à 25000rpm avec un rotor SW 28 (Beckman). Les particules virales culotées sont ensuite mises en suspension dans 100 µl de PBS1X, et stockées à -80°C.

H-Titration des particules virales et infection des cellules.

La titration des particules virales est réalisée par l'infection de cellules HEK293. 50 000 cellules sont ensemencées dans une plaque de culture cellulaire 24 puits (Falcon) dans 1 ml de milieu de culture. Le lendemain (J1) les cellules d'un puits sont décollées et numérotées. Ensuite, les HEK293 sont infectées avec 10 µl, 5 µl ou 1 µl d'une dilution au 1/10 des lentivirus, et incubées à 37°C pendant 72 heures. Puis, les cellules sont lavées et préparées pour une analyse par cytométrie en flux. Les cellules infectées sont marquées avec l'anti-CD90 couplé au Per-CP. En effet, le gène Thy1, présent dans le plasmide plentiThy1-Cla, code pour la molécule CD90 qui est donc exprimée à la surface de toutes les cellules infectées. On considère pour la titration qu'une particule virale infecte une cellule. Le titre de la suspension lentivirale est calculé comme suit :

$$\text{Concentration lentivirale} = (P \times N) / (Q \times D) \text{ particule infectieuse}/\mu\text{l}$$

P : pourcentage de cellules marquées avec anti-CD90 N : nombre de cellules à J1
Q : quantité de lentivirus déposé sur les cellules à J1 D : facteur de dilution

Le titre des suspensions lentivirales est indiqué dans le tableau 15.

siRNA	Concentration (particule infectieuse / μ l)
iGb3 synthase	
iGb3s-305	$11,4.10^5$
iGb3s-332	$18,4.10^5$
Glucosylcéramide synthase	
gcs-678	$1,9.10^4$
gcs-874	$7,3.10^4$
gcs-1357	1.10^4

Tableau 15 : Titre virale des lentivirus siRNA dirigés contre l'iGb3 et la glucosylcéramide synthase

Par la suite, les cellules HeLa CD1d sont infectées avec des MOI (multiplicité d'infection) de 10, 5 ou 1 particule virale par cellule cible. L'efficacité de l'infection et la fixation de la lectine GS1-B4 ou de l'anti-Gb3 sont ensuite analysées par cytométrie en flux

VII- Induction de l'expression de CD1d

C- Transfection plasmidique dans les HEK293

Nous disposons au laboratoire de l'ADNc du CD1d dans un vecteur pHbApr. L'insert CD1d est extrait de ce vecteur par digestion enzymatique avec Sal I et BamH I (Promega) et cloné dans le plasmide pCR3.1⁺ (Invitrogen), qui possède un gène de résistance à la néomycine.

Les cellules HEK293 sont transfectées avec le pCR3.1⁺ vide ou avec le pCR3.1⁺-CD1d, en utilisant la lipofectAMINE 2000 (Invitrogen) selon le protocole indiqué par le fournisseur. Après 24 heures, les cellules sont repiquées et l'expression du CD1d dans les cellules est contrôlée. Environ 16% des cellules expriment le transgène à ce stade. 48 heures après la transfection, les cellules sont transférées dans du milieu sélectif additionné de 0,8 mg/ml de néomycine (Sigma). Après 24 jours de sélection, 3 sous-groupes de cellules transfectées avec le pCR3.1⁺ vide ou avec le pCR3.1⁺-CD1d ont été séparés. L'expression du CD1d à la surface des cellules est évaluée par cytométrie en flux. Selon les groupes, 44% à 50% des cellules expriment le CD1d. Un clonage par dilution limite est réalisé afin d'obtenir

une population cellulaire exprimant de façon homogène le transgène. Deux populations transfectées avec le pCR3.1⁺ et quatre populations exprimant le CD1d sont conservées : HEK-pCR3.1⁺ clones 3 et 4 et HEK-CD1d clones 4, 6, 7 et 11. Seule les cellules HEK-CD1d clone 6 et HEK-pCR3.1⁺ clone 4 seront étudiées par la suite.

D-Infection lentivirale dans les Namalwa

La transfection stable des cellules Namalwa avec le vecteur pCR3.1⁺-CD1d n'a pas fonctionné. En effet, après l'échec de la transfection avec la lipofectAMINE, on réalise une transfection au phosphate de calcium (Invitrogen), selon les indications du fournisseur. Le rendement est excellent puisque 93% des cellules transfectées expriment le CD1d à leur surface 48 heures après la transfection. Néanmoins, les cellules ne résistent pas à la sélection antibiotique.

On adopte donc une autre technique : l'infection lentivirale. L'ADNc de CD1d est sous cloné dans le vecteur pLentiSffv (donné par R. Breatnach) à partir du plasmide pHbApr-CD1d. Ensuite, les particules virales lentiSffv-CD1d sont produites dans des cellules HEK293FT et purifiées selon le même protocole que lors de la production de siRNA. Un plasmide plenti-gfp est utilisé comme contrôle de la production des particules virales. La titration des particules virales est réalisée dans des cellules HEK293FT. L'efficacité de transfection est contrôlée par cytométrie en flux, et la concentration des lentivirus est calculée comme indiqué précédemment. La concentration est de $7,7.10^4$ particules infectieuses/ μ l.

Afin d'induire l'expression du CD1d dans les Namalwa, ces cellules sont infectées avec trois MOI différentes, 10:1, 5:1, et 1:1. Etant donnée la faible concentration des particules virales, j'infecte peu de cellules (68 000). 14 jours après l'infection, l'expression de CD1d à la surface des cellules est testée : 50% des cellules expriment le transgène.

Pour obtenir une population homogène quant à l'expression de CD1d, un tri magnétique est réalisé. Les billes Dynabeads M450 (Dyna) sont des billes magnétiques recouvertes d'anti-IgG souris. Elles permettent donc de purifier des cellules spécifiquement marquées par un anticorps de souris. 11 millions de cellules Namalwa-CD1d sont incubées avec l'anticorps anti-CD1d 51.1 (10 μ g/ml) dans 500 μ l de PBS 1X contenant 0,1% de BSA (Albumine sérique bovine) pendant 30 minutes, à 4°C. Après 2 lavages avec du PBS 1X 0,1% BSA, les cellules sont incubées dans 500 μ l de PBS 1X BSA 0,1% avec les billes M450 à une

concentration de 16 000 billes/ml, et incubées 4 heures à 4°C sous agitation circulaire. 500 µl de PBS 1X 0,1% BSA sont ajoutés au milieu et les billes sont mises au contact d'un aimant. Une incubation d'une minute permet la fixation du complexe billes-cellules à l'aimant. Le milieu est retiré et remplacé par 1 ml de PBS 1X 0,1% BSA. Cette opération est réalisée 7 fois. Enfin, les complexes billes-cellules sont mis en suspension dans du milieu de culture. Après 14 jours, les billes sont retirées du milieu par aimantation et les cellules triées analysées en cytométrie en flux.

Résultats

I- Un ligand endogène des NKTi ?

Des études antérieures dans notre laboratoire ont permis d'isoler des cellules NKTi présentant une réactivité contre des cellules tumorales en absence de ligand exogène : les cellules HeLa (lignée tumorale humaine). Nous disposons au laboratoire de cellules HeLa exprimant le CD1d suite à une transfection stable (Figure 18).

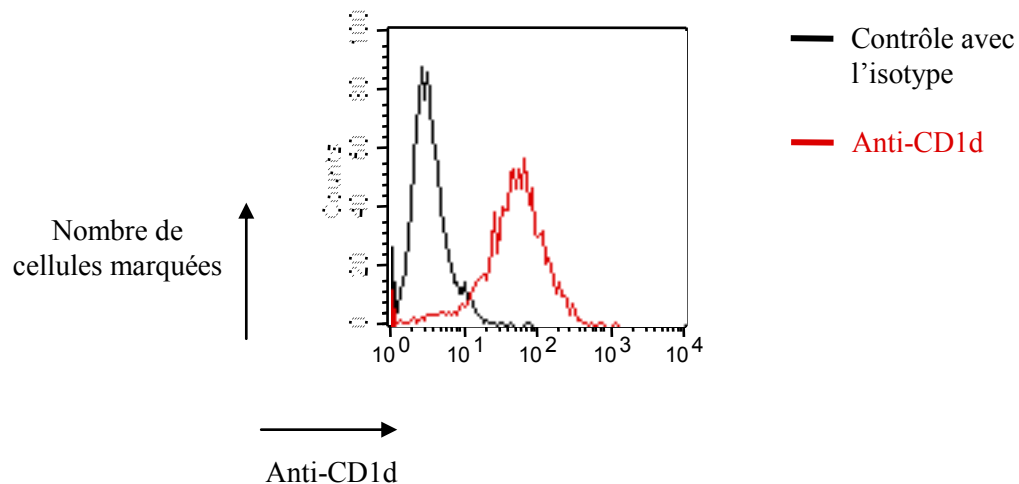


Figure 18 : Expression de CD1d par des cellules HeLa-CD1d. Les cellules sont incubées avec l'anticorps de souris anti-CD1d 51.1.

L'activation de différentes populations clonales de NKTi par ces lignées tumorales préincubées ou non avec le KRN7000 (α galactosylcéramide synthétique, fourni par l'équipe de Tanigushi) a permis d'isoler des populations clonales en fonction de leur réactivité vis-à-vis de ces cellules. L'activation des NKTi est évaluée par le dosage du TNF- α (Figure 19).

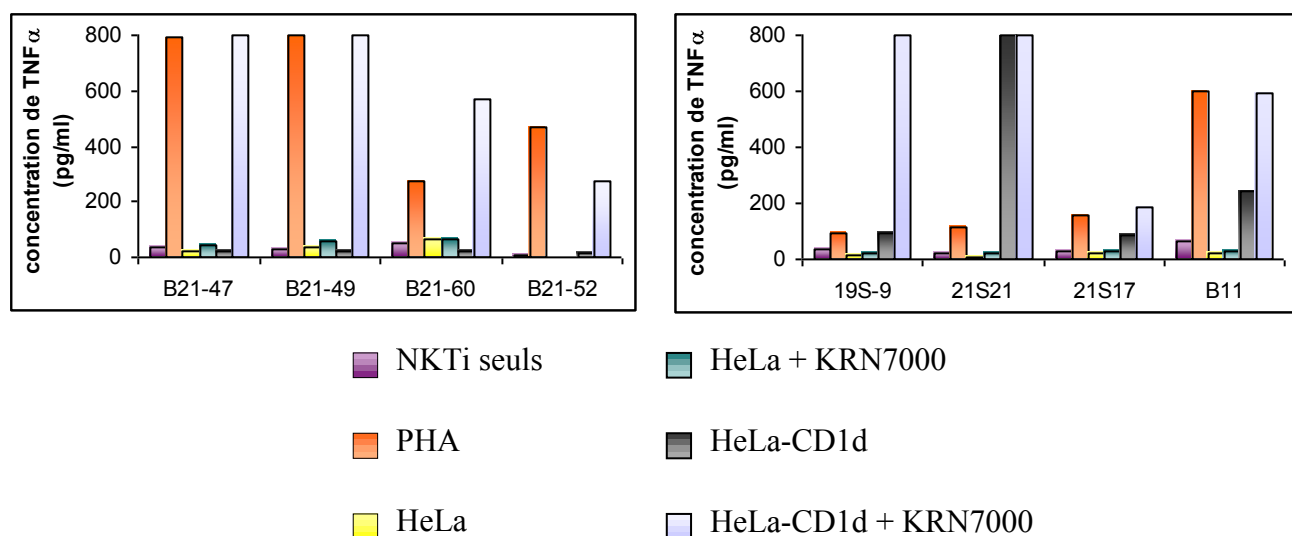


Figure 19 : Production de TNF- α par différents clones NKTi au contact de cellules HeLa-CD1d chargées ou non avec du KRN7000. Le KRN7000 est utilisé à une concentration de 0,1 μ g/ml. La production de TNF α est représentative d'au moins trois expériences.

L'utilisation de la PHA permet de contrôler l'expression maximale de cytokine par les clones NKTi suite à leur activation non spécifique. On peut distinguer les clones NKTi B21-60, B21-47 et B21-49 qui reconnaissent uniquement les HeLa-CD1d préincubées avec les KRN7000 ; et les clones NKTi B11, 21S-17, 21S-21, 19S-9, qui reconnaissent ces cellules en présence ou non de KRN7000. Ces clones sont dits autoréactifs.

Ces caractéristiques particulières des clones autoréactifs nous ont permis de poser notre hypothèse d'étude. En effet, si une reconnaissance des cellules tumorales humaines est possible par des clones NKTi humains, on peut supposer qu'elles expriment un ligand endogène des cellules NKTi. Les cellules NKTi reconnaissent un glycolipide portant un résidu Gal terminal, en anomérie α , comme par exemple le KRN7000. Cependant, chez l'Homme, le premier groupement Gal présent sur un céramide est toujours greffé en anomérie β . Il semble donc qu'un glycolipide plus complexe porteur d'un Gal terminal d'anomérie α soit reconnu par les cellules NKTi humaines.

Dans la famille GT6, deux enzymes sont responsables du transfert de galactose par une liaison α 1,3 sur un glycolipide : l' α 1,3-galactosyltransférase et l'iGb3 synthase. Les glycolipides issus de l'action de ces enzymes pourraient donc être des antigènes candidats

reconnus par les NKTi, dans le contexte du CD1d. L' α 1,3-galactosyltransférase humaine n'est pas fonctionnelle chez l'Homme et porte de nombreuses mutations. Nous nous intéressons donc à l'iGb3 synthase. Cette enzyme transfère un galactose en anomérie α 3 sur le lactosylcéramide pour donner naissance à l'iGb3. La comparaison des structures de l'iGb3 et de l' α galactosylcéramide met en évidence la position similaire du résidu Gal terminal dans ces deux glycolipides (Figure 20).

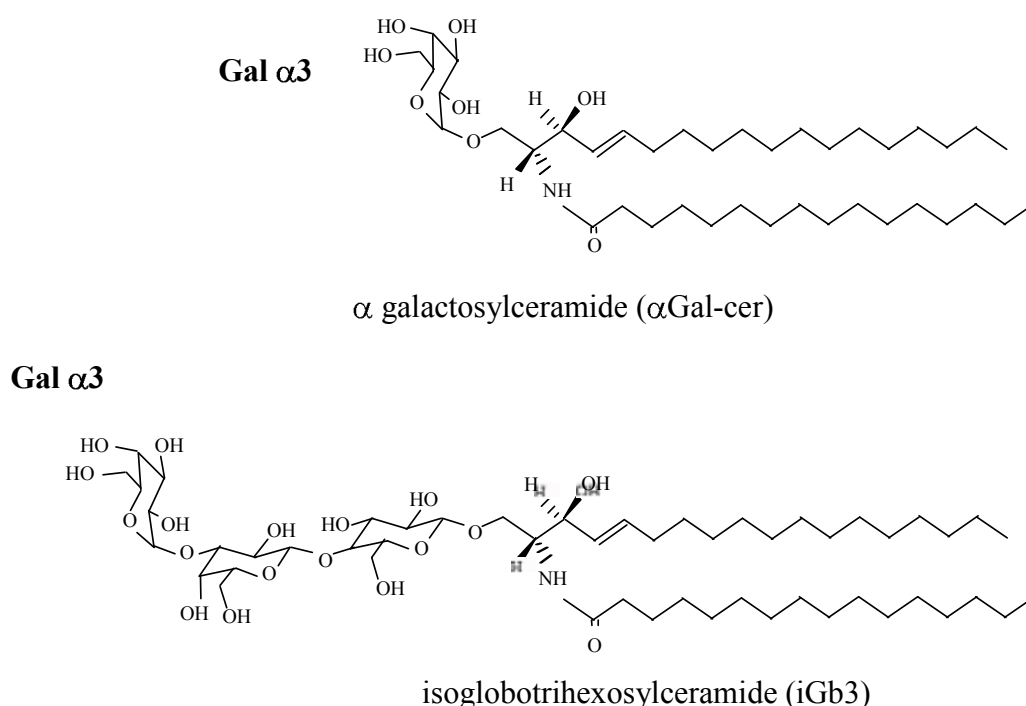


Figure 20 : Structures schématiques de l' α galactosylcéramide et de l'iGb3.

La ressemblance entre l' α galactosylcéramide et l'iGb3 nous conduit à formuler l'hypothèse que le ligand endogène des cellules NKTi pourrait être l'iGb3, exprimé par les cellules HeLa et reconnu dans le contexte du CD1d par les clones NKTi autoréactifs. Nous nous attacherons donc à l'étude de cellules cibles sur lesquelles se fixe la lectine GS1-B4, et à l'expression de l'iGb3 synthase dans ces cellules. Il est à noter que durant la réalisation de ce travail, l'équipe d'A. Bendelac a montré que l'iGb3 était effectivement un ligand endogène des NKTi chez la souris (Zhou et al., 2004b). Mais il reste à voir si c'est également le cas chez l'Homme. Il n'existe pas d'anticorps anti-iGb3. Pour rechercher la présence de ce glycolipide sur des cellules humaines, nous avons utilisé la lectine GS1-B4.

La lectine *Griffonia simplicifolia* isolectine B4 (GS1-B4) reconnaissant les résidus Gal terminaux en liaison $\alpha 1,3$ peut être utilisée pour montrer leur présence sur des cellules ou des tissus. Elle a largement été utilisée dans le cadre d'identification des xénoantigènes. Cependant, il semblerait que cette lectine reconnaisse les résidus Gal terminaux en liaison $\alpha 1,3$ et $\alpha 1,4$ sur des osides synthétiques (Kirkeby and Moe, 2001). Pour contrôler la fixation spécifique de GS1-B4 sur des galactose en liaison $\alpha 1,3$ à la surface des cellules, des cellules Namalwa exprimant le Gb3 (Namalwa-Gb3 #67) suite à une transfection stable (données par Joëlle Wiels) sont analysées par cytométrie en flux (Figure 21).

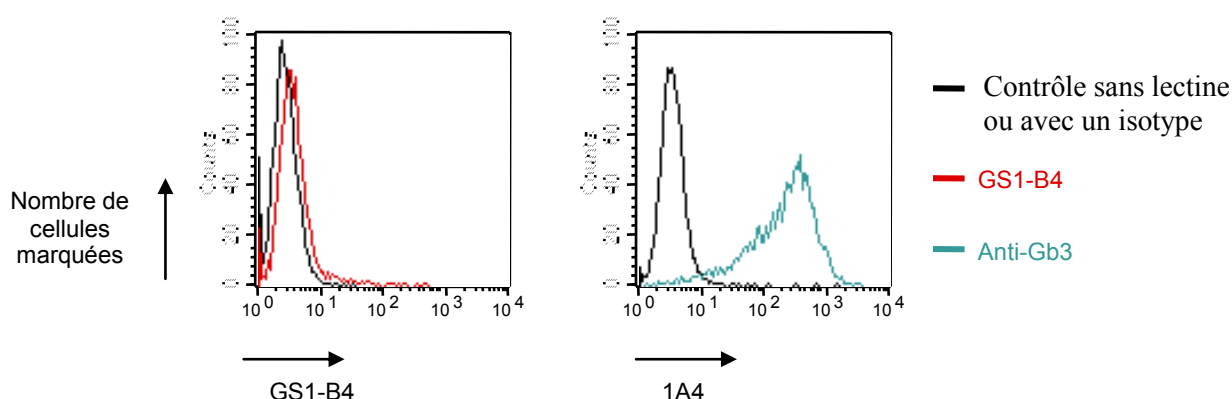


Figure 21 : Fixation de la lectine GS1-B4 (A) ou de l'anticorps anti-Gb3 (1A4) (B) sur des cellules Namalwa-Gb3 #67. **A :** les cellules sont incubées seules (noir) ou en présence de GS1-B4 (rouge). **B :** les cellules sont incubées avec un contrôle isotypique (noir) ou avec l'anticorps 1A4 (bleu).

Les cellules Namalwa-Gb3 #67 sont marquées avec l'anticorps 1A4 mais pas avec la lectine GS1-B4. Il semble que sur les cellules, la lectine GS1-B4 est spécifique des résidus Gal terminaux liés en $\alpha 1,3$, et non en $\alpha 1,4$. La lectine GS1-B4 reconnaissant les résidus Gal terminaux en liaison $\alpha 1,3$ peut être utilisée pour montrer la présence de résidus Gal terminaux sur des coupes de tumeurs humaines. Néanmoins, la fixation en paraffine entraînant une forte diminution de la quantité de glycolipides, un antigène glycolipidique portant un Gal terminal en liaison $\alpha 1,3$ ne sera pas mis en évidence. L'utilisation de tumeurs congelées est donc préférable pour l'étude des glycolipides. Nous avons donc étudié la fixation de la lectine GS1-B4 sur des tumeurs colorectales fixées et congelées, afin de détecter la présence éventuelle de glycolipide portant des résidus Gal $\alpha 3$ terminaux (Figure 22).

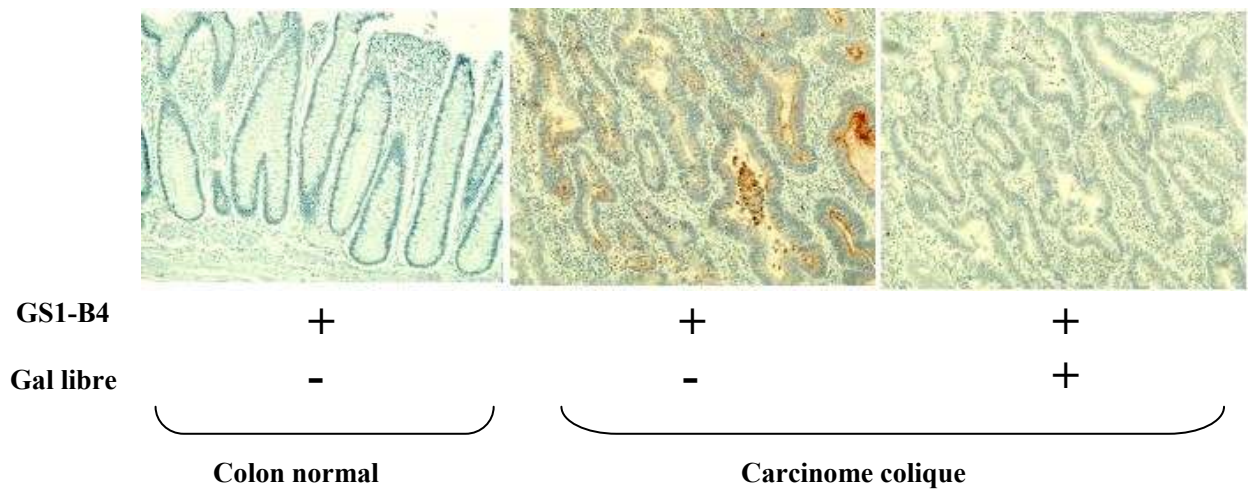


Figure 22 : Fixation de la lectine GS1-B4 sur des coupes congelées de tissus normal ou tumoral. Le marquage des coupes par GS1-B4 est réalisée en présence ou non de galactose à une concentration de 100 mM.

Aucune fixation de la lectine GS1-B4 sur le tissu normal n'est mise en évidence. Au contraire, le tissu tumoral est fortement marqué, au niveau de l'appareil de Golgi et à la surface de cellules épithéliales. Quand la lectine GS1-B4 est coïncubée avec 100 mM de galactose libre, sa fixation sur le tissu est inhibée, ce qui démontre la spécificité de ce marquage. En parallèle, la fixation de la lectine GS1-B4 sur les tissus fixés du même individu est évaluée. Dans ces conditions, les coupes tumorales ne sont pas ou peu marquées au niveau du Golgi (résultats non présentés). Ceci correspond aux résultats publiés précédemment montrant l'absence de fixation de la lectine sur des tissus humains en accord avec l'absence du xénoantigène $\alpha 3$ Gal (Milland et al., 2006). Il semble donc que la lectine GS1-B4 reconnaissent spécifiquement un glycolipide présentant un résidu Gal terminal sur des coupes tumorales humaines.

C-Interaction des NKTi avec des cellules tumorales

1- Identification de lignées tumorales, cibles potentielles des NKTi

a/ Les cellules HeLa

- Caractérisation phénotypique des cellules HeLa

Les cellules HeLa sont issues d'un cancer ovarien d'une femme de groupe sanguin O. Comme indiqué précédemment, nous disposons de cellules exprimant le CD1 et reconnues par les clones NKTi autoréactifs. Il semblerait donc que ces cellules expriment le ligand endogène de ces clones. Afin de définir s'il est possible que ce ligand soit l'iGb3, nous réalisons un marquage des cellules avec la lectine GS1-B4 et une analyse par cytométrie en flux (Figure 23).

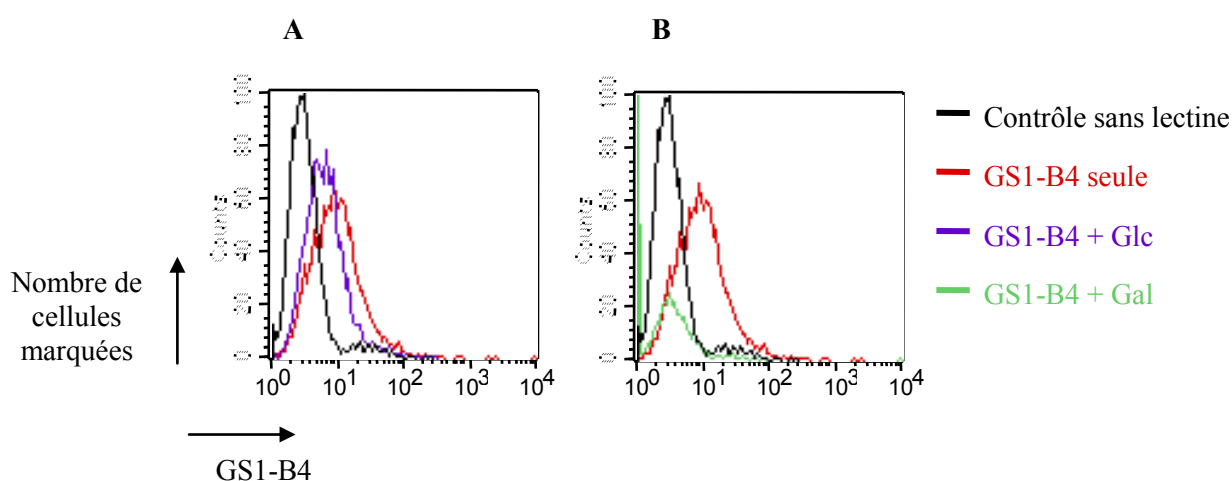


Figure 23 : Fixation de la lectine GS1-B4 à la surface de cellules HeLa-CD1d, en présence ou non de glucose (A) ou de galactose (B) à une concentration de 500 mM. Cet histogramme est représentatif de deux expériences d'inhibition.

La lectine GS1-B4 reconnaît un antigène présent à la surface des cellules HeLa-CD1d. La spécificité de ce marquage est contrôlée par la coincubation de la lectine avec les cellules et un glucide libre (Glc ou Gal). Le Gal libre permet d'inhiber la fixation spécifique de la lectine GS1-B4. Les cellules coincubées avec le Gal et la lectine GS1-B4 présentent un taux

de mortalité plus important, ce qui explique le faible nombre de cellules marquées. Cependant, l'inhibition du marquage des cellules avec la GS1-B4 après co-incubation avec le Gal est quasi complète (Figure 23 B) alors qu'elle n'est que de 30% en présence de Glc (Figure 23 A). Il semble donc que la lectine reconnaisse spécifiquement un résidu Gal terminal sur les cellules HeLa-CD1d.

L'utilisation d'une lectine ne permet pas d'identifier de façon formelle l'antigène reconnu. En effet, la lectine GS1-B4 connue pour sa spécificité $\alpha 3$ Gal, peut également reconnaître, dans certaines conditions, des Gal en conformation $\alpha 4$. Contrairement à un anticorps, la lectine ne permet pas d'identifier l'antigène reconnu. On réalise donc des études complémentaires afin de préciser la nature de la molécule reconnue par GS1-B4.

Dans un premier temps, l'utilisation d' α galactosidases va permettre de confirmer la liaison du Gal reconnu par GS1-B4. Nous disposons de deux galactosidases :

- une α galactosidase extraite de grains de café vert, spécifique des Gal liés en $\alpha 1,3/4$ et 6.
- une $\alpha 3,6$ galactosidase recombinantes produite dans *Escherichia coli*, spécifique des Gal liés en $\alpha 1,3/6$.

En parallèle, les cellules HeLa-CD1d sont incubées avec un anticorps dirigé contre le Gb3 (Gal $\alpha 1,4$ Gal $\beta 1,4$ Glc $\beta 1$ -Cer) qu'elles expriment à leur surface. L'étude de la fixation de l'anti-Gb3 après action des galactosidases permet de contrôler la spécificité des enzymes.

Les cellules HeLa-CD1d subissent l'action de ces deux enzymes et sont analysées par cytométrie en flux (Figure 24).

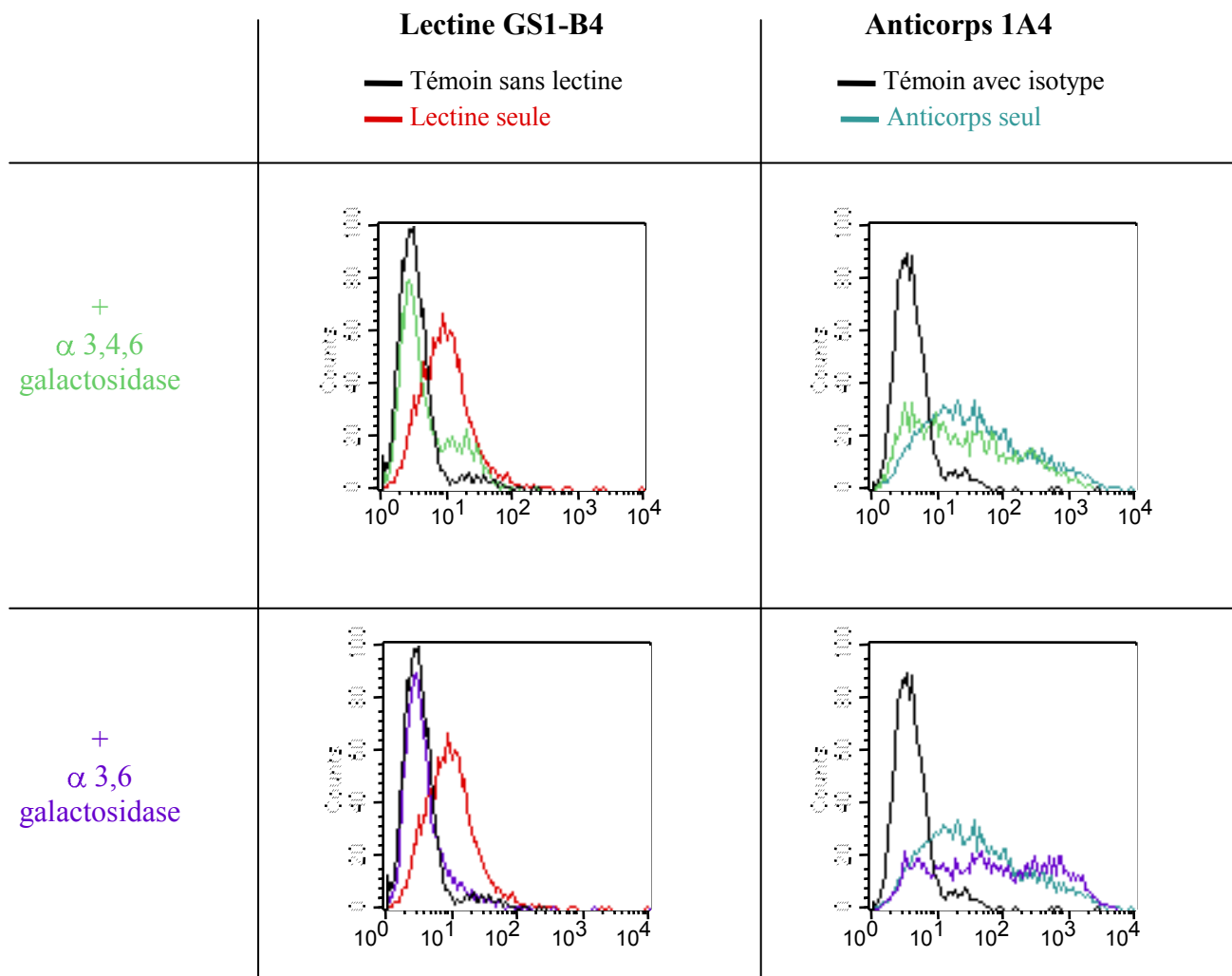


Figure 24 : Fixation de la lectine GS1-B4 et de l'anti-Gb3 (1A4) à la surface de cellules HeLa-CD1d après action de galactosidases. Les marquages avec la GS1-B4 (à gauche) ou l'anticorps 1A4 (à droite) après l'action de l' α 3,4,6 galactosidase (vert) et de l' α 3,6 galactosidase (violet) sont représentés, et superposés au marquage avec GS1-B4 (rouge) ou 1A4 (bleu) avant action des glycosidases.

Après action de l' α 3,4,6 galactosidase, on observe une nette diminution du marquage avec la lectine, mais certaines cellules sont encore GS1-B4⁺. La fixation de l'anti-Gb3 n'est que faiblement diminuée. Les cellules HeLa-CD1d expriment le Gb3 de façon très hétérogène, ce qui pourrait expliquer que la diminution du Gb3 à la surface des cellules soit peu visible. En effet, après une action partielle de la galactosidase (comme l'indiquerait le marquage avec la lectine GS1-B4), des cellules exprimant fortement le Gb3 en présenteront toujours un peu à leur surface. Après action de l' α 3,6 galactosidase, la lectine GS1-B4 ne se

fixe plus sur les cellules HeLa. Par contre, aucune modification du marquage avec l'anti-Gb3 n'est observée, ce qui confirme la spécificité de la glycosidase (le Gb3 présente un Gal terminal en conformation $\alpha 4$) et de la lectine GS1-B4 qui ne reconnaît pas le Gb3.

Il semble donc que la lectine GS1-B4 reconnait un résidu $\alpha 3$ Gal ou $\alpha 6$ Gal sur les cellules HeLa-CD1d. Aucune structure présentant un Gal terminal lié en $\alpha 1,6$ n'a été identifiée chez l'Homme. Il est donc probable que ce soit un $\alpha 3$ Gal terminal qui est reconnu.

Dans un deuxième temps, nous nous intéressons à la structure portant ce Gal terminal. En effet, les résultats des analyses immunohistochimiques présentés précédemment laissent penser que la lectine GS1-B4 reconnaît un glycolipide sur les tumeurs. L'utilisation de PPMP (D,L-thréo-1-phényl-2-hexadécanolamino-3-morpholino-1-propanol) nous permettrait de préciser si la structure reconnue par GS1-B4 sur les cellules est glycoprotéique ou glycolipidique. En effet, le PPMP inhibe la synthèse du glucosylcéramide permettant ainsi une diminution de la synthèse des glycolipides cellulaires (Yowler et al., 2002). L'action du PPMP sur les cellules HeLa-CD1d est présentée dans la figure 25.

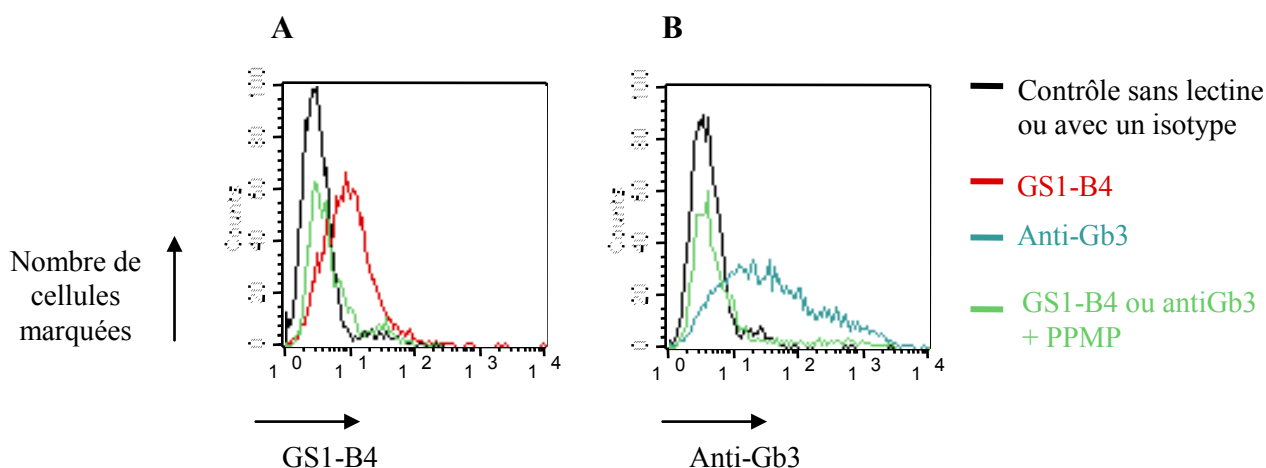


Figure 25 : Fixation de la lectine GS1-B4 (A) et de l'anti-Gb3 (B) à la surface de cellules HeLa-CD1d après action du PPMP. Le marquage avec la GS1-B4 ou l'anticorps 1A4 après l'incubation des cellules pendant 48 heures avec du PPMP à une concentration de 7,5 μ M (vert) est superposé au marquage avec GS1-B4 (rouge) ou 1A4 (bleu) sur des cellules non traitées.

L'étude de la fixation de l'anti-Gb3 sur les cellules permet de contrôler l'efficacité du traitement PPMP. Le Gb3 est un glycolipide et il voit son expression diminuer en présence de PPMP (Figure 25 B). On constate également une nette diminution de la fixation de la lectine GS1-B4 sur les cellules HeLa-CD1d après traitement avec le PPMP, ce qui suppose qu'elle se fixe sur un glycolipide (Figure 25 A).

L'ensemble de ces résultats nous permettent donc de supposer que l'antigène reconnu par la lectine GS1-B4, sur les cellules HeLa-CD1d est un glycolipide présentant un α 3Gal terminal. Cet antigène pourrait donc être l'iGb3 mais on ne peut pas l'affirmer car sa structure n'a pas été caractérisée.

Pour compléter notre étude, nous cherchons à inhiber spécifiquement l'expression de l'iGb3 dans les cellules HeLa-CD1d par l'utilisation de petits ARN d'interférence (siRNA).

- Interférence à l'ARN dans les cellules HeLa

Pour contrôler si l'iGb3 est l'antigène reconnu sur les cellules HeLa par la lectine GS1-B4, nous avons cherché à inhiber l'expression de deux enzymes dans ces cellules : l'iGb3 synthase et la glucosylcéramide synthase responsable de la synthèse du glucosylcéramide, précurseur de l'iGb3. Dans ce but, des petits ARN d'interférence (siRNA) dirigés contre ces deux gènes sont synthétisés. L'ARN interférence a été mise en évidence chez les plantes et les nématodes. Ce mécanisme cellulaire est largement conservé dans l'évolution. En fait, les siRNA introduit dans la cellule s'associent au complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui les guide vers l'ARN cible et détruit l'ARN double brin formé suite à la fixation des siRNA. L'expression du gène cible est donc inhibée.

- Interférence à l'ARN dirigée contre la glucosylcéramide synthase

Les siRNA sont sélectionnés puis clonés dans le plasmide pSuper comme indiqué dans la partie matériel et méthodes. Pour la glucosylcéramide synthase, les trois siRNA utilisés sont nommés gcs-678, gcs-874 et gcs-1357, le nombre indiquant la position de la première base sur l'ADNc de la glucosylcéramide synthase. L'efficacité des siRNA est contrôlée par une transfection transitoire des cellules HEK293 avec le plasmide pSuper contenant le siRNA. En effet, comme nous le montrerons plus loin, il semble que la lectine GS1-B4 se fixe sur un

glycolipide présent à la surface des cellules HEK293. Si les siRNA sont efficaces et que l'iGb3 est l'antigène reconnu par la lectine GS1-B4, nous devrions observer une diminution de la fixation de GS1-B4 sur les cellules transfectées. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux 48 heures après la transfection. Aucune variation de la fixation de la lectine GS1-B4 n'est visible (résultats non présentés). Une autre méthode d'évaluation de l'efficacité des siRNA est donc utilisée : le dosage de l'activité luciférase en présence des siRNA et d'un gène de fusion entre l'ADNc de la glucosylcéramide synthase et celui de la luciférase de firefly.

Les plasmides pRLTK et pGL3 codent respectivement pour les luciférases de renilla et de firefly. L'ADNc de la glucosylcéramide synthase est sous-cloné dans le pGL3, de façon à obtenir un gène de fusion entre l'ADNc de la glucosylcéramide synthase et celui de la luciférase. En parallèle, on dispose des plasmides codant pour des siRNA spécifiques de la luciférase de firefly (pSHAG-Ff1) ou de la glucosylcéramide synthase (pSuper-gcs678, pSuper-gcs874, pSuper-gcs1357). La cotransfection du plasmide codant pour l'ADNc de fusion glucosylcéramide synthase-luciférase de firefly et des siRNA dirigés contre la glucosylcéramide synthase entraînera donc une diminution de l'activité luciférase par la destruction de l'ARN de fusion suite à l'accrochage des siRNA (Figure 26).

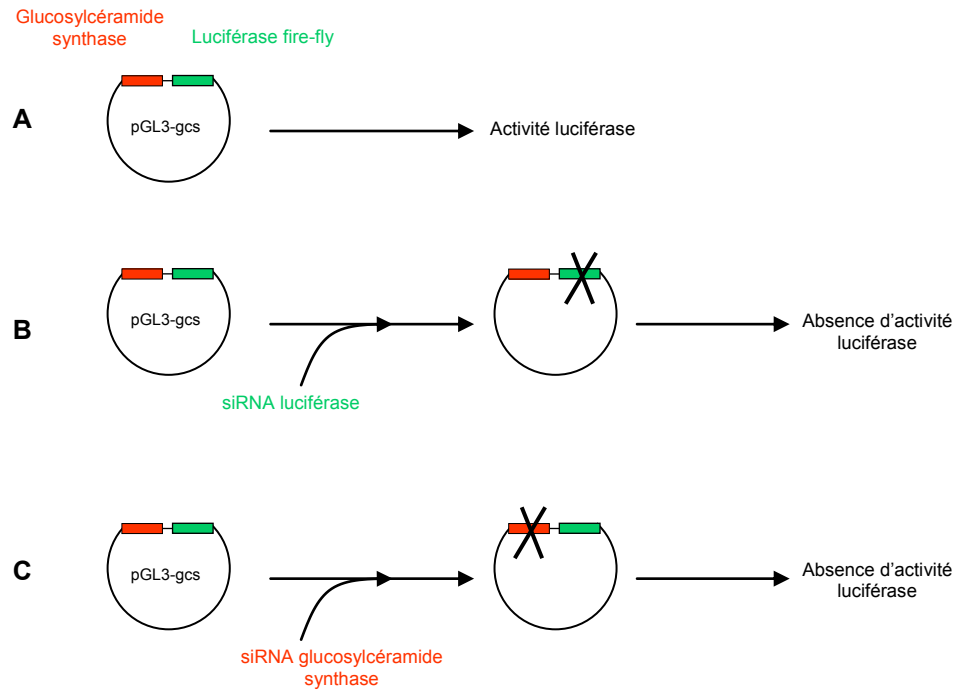


Figure 26 : Schématisation du principe de maintien ou non de l'activité luciférase en présence ou non de siRNA spécifique. **A :** contrôle positif, sans siRNA, **B :** contrôle négatif, activité luciférase minimale, avec le siRNA dirigé contre l'ADNc de la luciférase, **C :** test des siRNA dirigés contre l'ADNc de la glucosylcéramide synthase.

Les différentes conditions de transfection sont présentées dans le tableau 16. Chaque transfection est réalisée en duplicates.

	luciférase renilla	luciférase firefly +/- glucosylcéramide synthase	siRNA
Luci+	pRLTK	pGL3	pSuper
Luci-	pRLTK	pGL3	pSHAG-Ff1
Luci-GCS+	pRLTK	pGL3-GCS	pSuper
Luci-GCS-	pRLTK	pGL3-GCS	pSHAG-Ff1
GCS-678	pRLTK	pGL3-GCS	pSuper-gcs678
GCS-874	pRLTK	pGL3-GCS	pSuper-gcs874
GCS-1357	pRLTK	pGL3-GCS	pSuper-gcs1357

Tableau 16 : Cotransfections réalisées pour tester l'efficacité des siRNA dirigés contre la glucosylcéramide synthase. Luci+ / Luci-GCS+ : contrôle de l'activité luciférase avec la transfection du plasmide pGL3 avec ou sans l'ADNc de la glucosylcéramide synthase en absence de siRNA. Luci- / Luci-GCS- : diminution maximale de l'activité luciférase due au siRNA dirigé contre l'ADNc de la luciférase.

Quarante huit heures après la transfection, les cellules HEK sont lysées et l'activité luciférase mesurée dans les différentes conditions. La mesure de l'activité luciférase de renilla permet de standardiser l'activité luciférase de firefly, par le calcul du rapport entre l'activité luciférase de firefly et celle de renilla. Les résultats sont présentés dans la figure 27.

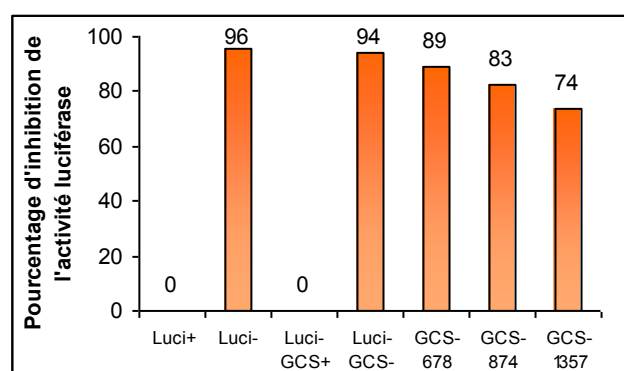


Figure 27 : Pourcentage d'inhibition de l'activité luciférase dans les cellules HEK293 transfectées dans différentes conditions. Les résultats représentent la moyenne des dosages des duplicates de transfection.

L'activité luciférase de firefly est inhibée à 94% suite à la cotransfection de pGL3-GCS avec le siRNA spécifique de la luciférase. La cotransfection de ce même plasmide avec les siRNA dirigés contre la glucosylcéramide synthase gcs-678, gcs-874 et gcs-1357 permet respectivement une diminution de l'activité luciférase de 89%, 83%, et 74% . Il semble donc que les siRNA dirigés contre la glucosylcéramide synthase soient efficaces, même si l'inhibition est moins importante que celle observée par l'action du siRNA dirigé contre la luciférase. Nous décidons donc de cloner les deux siRNA gcs-678 et gcs-874 dans un vecteur plentiThy1-Cla, permettant la production de particules lentivirales pour infecter les cellules HeLa-CD1d, de façon à inhiber spécifiquement la glucosylcéramide synthase et donc la potentielle production d'iGb3.

Les cellules HeLa-CD1d sont infectées avec trois MOI (multiplicité d'infection) différentes : 10, 5 ou 1 particule virale par cellule. Les lentivirus produits possèdent l'ADNc de CD90, l'étude de son expression membranaire permet donc le contrôle de l'efficacité de l'infection. En parallèle, le marquage du Gb3 membranaire permet de contrôler l'efficacité de l'inhibition de la glucosylcéramide synthase par les siRNA, le glucosylcéramide étant le précurseur de ce glycolipide (figure 28).

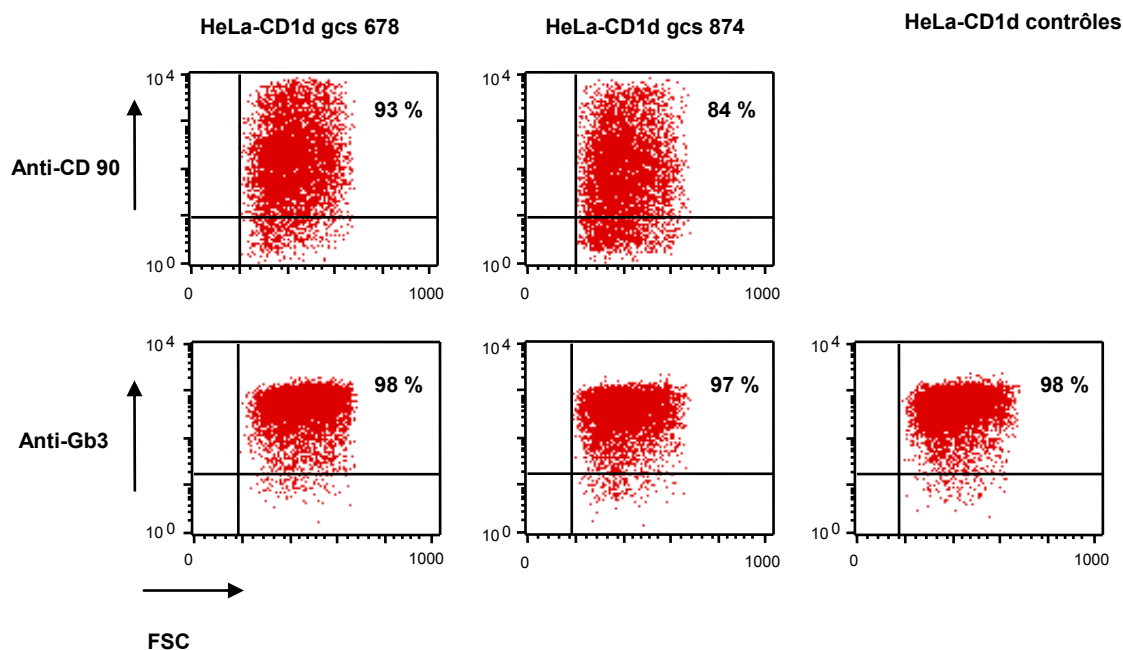


Figure 28 : Marquage membranaire de CD90 et de Gb3 sur des cellules HeLa-CD1d infectées ou non avec les siRNA. Les HeLa-CD1d non infectées n'expriment pas le CD90. L'expression de CD90 à la surface des cellules est induite par le lentivirus et permet de contrôler l'efficacité de l'infection. Les pourcentages indiqués représentent le pourcentage de cellules marquées avec l'anticorps.

L'efficacité de transduction des cellules par les siRNA est de 84% et 93%. Nous devrions donc observer une diminution de l'expression membranaire de Gb3, or aucune variation n'est visible. Pourtant, le dosage de l'activité luciférase dans des cellules transfectées de façon transitoire avec les siRNA montrait qu'ils étaient efficaces (figure 27).

- Interférence à l'ARN dirigée contre l'iGb3 synthase

Les siRNA sont sélectionnés puis clonés dans le plasmide pSuper comme indiqué dans la partie matériel et méthodes. Pour l'iGb3 synthase, les deux siRNA utilisés sont nommés iGb3s-305, iGb3s-332, le nombre indiquant la position de la première base sur l'ADNc de l'iGb3. L'efficacité des siRNA est contrôlée par transfection transitoire des cellules HEK293 avec le plasmide pSuper contenant le siRNA. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux 48 heures après la transfection (figure 29).

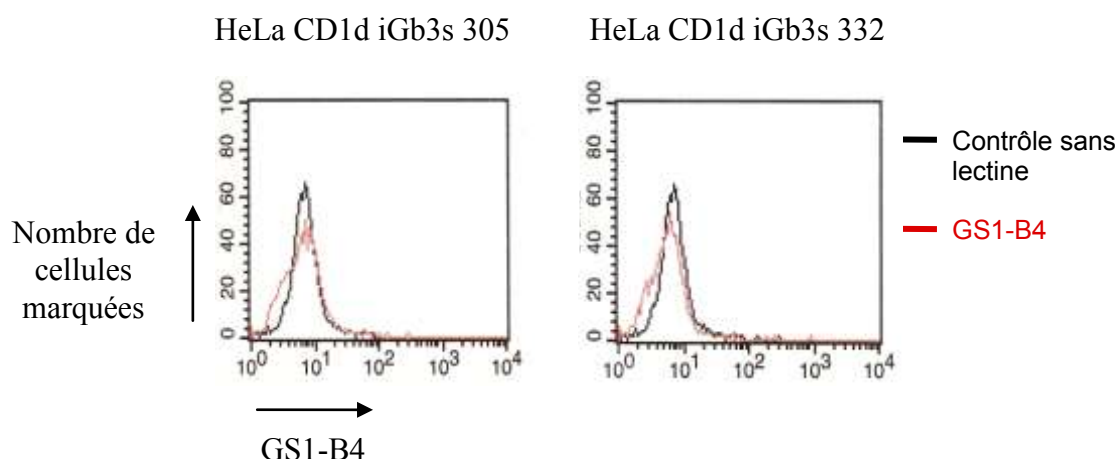


Figure 29 : Fixation de GS1-B4 sur des cellules HEK293 transfectées transitoirement avec pSuper vide, pSuper-iGb3s305, pSuper-iGb3s-332 ou pSuper-iGb3s-395. La fixation de GS1-B4 sur les cellules transfectées avec le vecteur vide (noire) est superposée au marquage des cellules transfectées avec le pSuper-siRNA (rouge).

On peut observer une diminution du marquage avec la lectine IB4 sur les HEK293 transfectées avec les siRNA iGb3s-305 et iGb3s-332. Cette diminution est faible, mais le profil de marquage (diminution du signal avec un gonflement à gauche) semble caractéristique d'une interférence à ARN suite à une transfection transitoire. Nous produisons donc des lentivirus siRNA iGb3s-305 et iGb3s-332 et des cellules HeLa sont infectées avec les particules lentivirales comme présenté ci-dessus, pour les siRNA dirigés contre la glucosylcéramide synthase. La transduction des cellules HeLa-CD1d est efficace (respectivement 85% et 90% de cellules infectées avec iGb3s-305 et iGb3s-332) mais ne permet pas de diminution du marquage avec la lectine GS1-B4.

L'utilisation de siRNA n'a permis d'inhiber l'expression ni du ligand de la GS1-B4 ni du Gb3. Cette technique ne semble pas appropriée pour inhiber ce type d'activité enzymatique. Pour contrôler si l'iGb3 peut être exprimé dans les cellules HeLa, nous souhaitons cloner l'ADNc de l'iGb3 synthase dans ces cellules.

- Clonage de l'ADNc de l'iGb3 synthase dans les cellules HeLa

Différentes stratégies ont été adoptées pour cloner l'ADNc de l'iGb3 synthase : amplification de l'ADNc complet par PCR avec une Taq polymérase classique, puis avec une

Taq polymérase spécifique des séquences riches en nucléotides G et C (l'ADNc de l'iGb3 synthase se compose de 75% de nucléotide G et C), et enfin une amplification par RACE-PCR. Aucune de ces techniques n'a permis d'isoler cet ADNc de l'iGb3s.

Lors de cette étude, l'amplification de la séquence entre les exons 3 et 4 de l'ADNc iGb3 synthase a mis en évidence la présence d'un intron. Même si le contrôle de nos ADNc ne montre aucune contamination génomique (amplification d'une séquence de $\beta 2m$ de 107 pb, et non 725 pb si il y avait de l'ADN génomique), nous poursuivons notre étude sur de l'ADNc issu de testicule humain acheté dans le commerce, pour n'avoir aucun doute sur la pureté de l'ADNc. L'utilisation de cet ADNc commercial ne permet pas non plus l'amplification de l'ADNc de l'iGb3 synthase. En revanche, l'amplification de l'intron entre les exons 3 et 4 est également possible avec cet ADNc, alors que nous pouvons exclure une éventuelle contamination génomique, même faible. L'ADNc de l'iGb3 synthase humaine n'a pas été cloné à ce jour. Cependant, si aucune étude n'a été conduite sur la fonctionnalité de l'iGb3 synthase humaine, les études de Taylor et Milland suggèrent un problème lors de l'épissage de l'ARN messenger (Milland et al., 2006; Taylor et al., 2003).

Etant données les difficultés que nous rencontrons à amplifier l'ADNc de l'iGb3s, nous souhaitons analyser par PCR les séquences présentes entre les différents exons de l'iGb3s, afin de rechercher l'existence de formes mineures correctement épissées. Des amorces sont définies sur les exons, et leur localisation est précisée sur la figure 30.

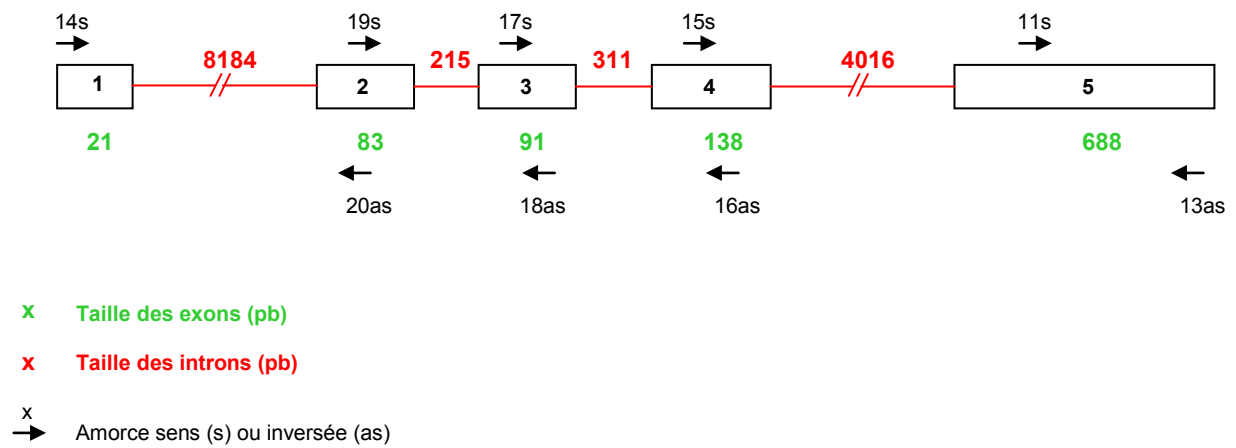


Figure 30 : Schéma de la localisation des amorces utilisées pour l'étude de l'ADNc de l'iGb3 synthase. Les 5 exons codants du gène de l'iGb3 synthase sont représentés. La taille des exons est indiquée en vert et celle des introns en rouge.

Les PCR avec les différentes amorces sont réalisées sur l'ADNc commercial de testicule humain et les produits sont déposés sur un gel d'agarose afin d'être analysés (Figure 31).

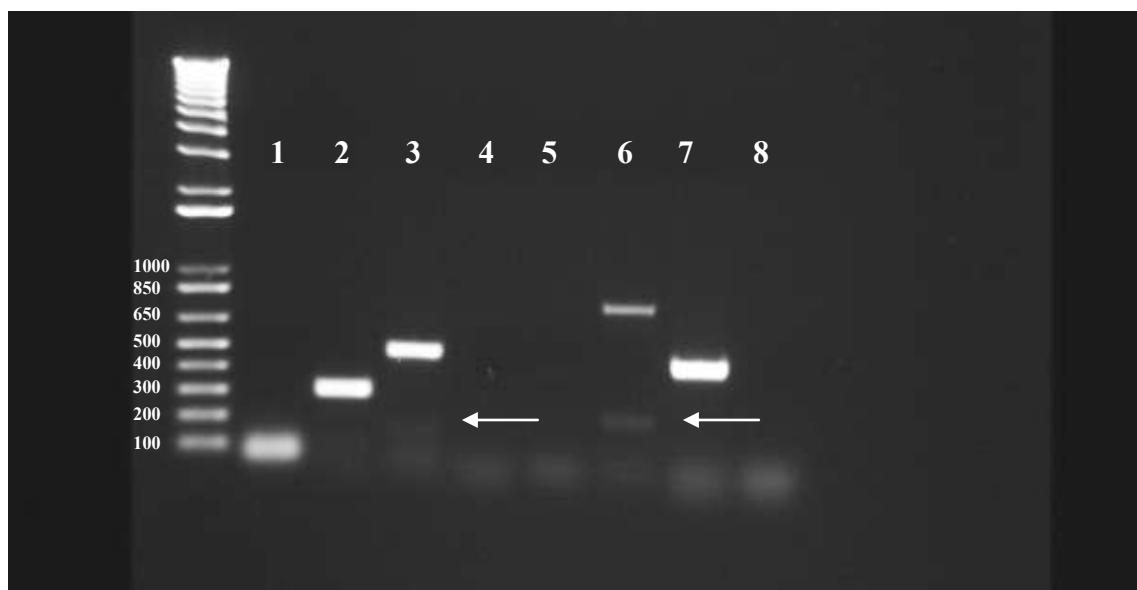


Figure 31 : Produits d’amplification des séquences entre les différents exons après migration sur un gel 1% d’agarose. Les flèches blanches indiquent les bandes de faible intensité, correspondantes à l’ADNc épissé de l’iGb3 synthase. Les tailles des amplicons attendus sont indiquées ci-dessous, selon chaque couple d’amorces, respectivement en noir après épissage correct de l’ARNm ou en rouge en absence d’épissage.

1 : 14s – 20as (exon 1 – 2)	100 / 130 pb	5 : 14s – 16as (exon 1 – 4)	296 / 850 pb
2 : 19s – 18as (exon 2 - 3)	81 / 297 pb	6 : 19s – 16as (exon 2 – 4)	219 / 743 pb
3 : 17s – 16as (exon 3-4)	160 / 468 pb	7 : 11s – 13as (exon 5)	438 pb
4 : 14s – 18as (exon 1 – 3)	158 / 406 pb	8 : 11s – 13as sans ADN	

La plupart des couples d’amorces permettent une amplification de la séquence intronique. Quand il n’y a pas d’amplification (par exemple dans les puits 1, 4 et 5), cela peut s’expliquer par la présence d’un intron de grande taille (8184 pb entre exon 1 et 2). La contamination par de l’ADN génomique ne peut pas expliquer ce phénomène, étant donné que nous travaillons avec de l’ADNc commercial dont l’absence de contamination a été vérifiée. Il semble donc que l’ARN messager de l’iGb3 synthase n’est pas correctement épissé, comme l’avaient suggéré Taylor et Milland.

Néanmoins, la PCR réalisée entre les exons 2 et 4 (puits 6) permet l’amplification de deux séquences. La première, d’environ 800 pb est majoritaire, et correspondrait à une forme non épissée. La seconde séquence, de 219 pb, pourrait être une forme épissée de l’iGb3 synthase, qui resterait cependant largement minoritaire. De même, dans le puits 3, on

distingue une bande à environ 150 pb, qui pourrait correspondre au produit d'amplification entre les exons 3 et 4, après épissage.

Il semblerait qu'il y ait un problème d'épissage de l'ARN messager de l'iGb3 synthase chez l'Homme, ce qui entraînerait l'inactivation de cette enzyme, mais il est possible qu'une forme correctement épissée existe, trop minoritaire pour être clairement mise en évidence. Nos tentatives de clonage de cette forme minoritaire ont échoué. L'étude de l'ADNc de l'iGb3 synthase ne nous permet donc pas de conclure quant à sa fonctionnalité chez l'Homme.

L'étude des cellules HeLa a permis de mettre en évidence un ligand de surface de la lectine GS1-B4, porté par un glycolipide présentant un $\alpha 3$ Gal terminal. L'étude plus spécifique de l'iGb3 synthase (inhibition par interférence à ARN ou clonage de l'ADNc) a échoué. D'autres lignées tumorales sont étudiées pour comparer la réactivité des NKTi contre des cellules aux profils de fixation de la GS1-B4 variés.

b/ Les cellules HEK293

- Caractérisation phénotypique des cellules HEK293

Les cellules HEK293 sont issues de la transformation de cellules de rein embryonnaires. Un marquage avec GS1-B4 montre la fixation de la lectine sur ces cellules (Figure 32 A) qui est inhibée après action du PPMP (Figure 32 B).

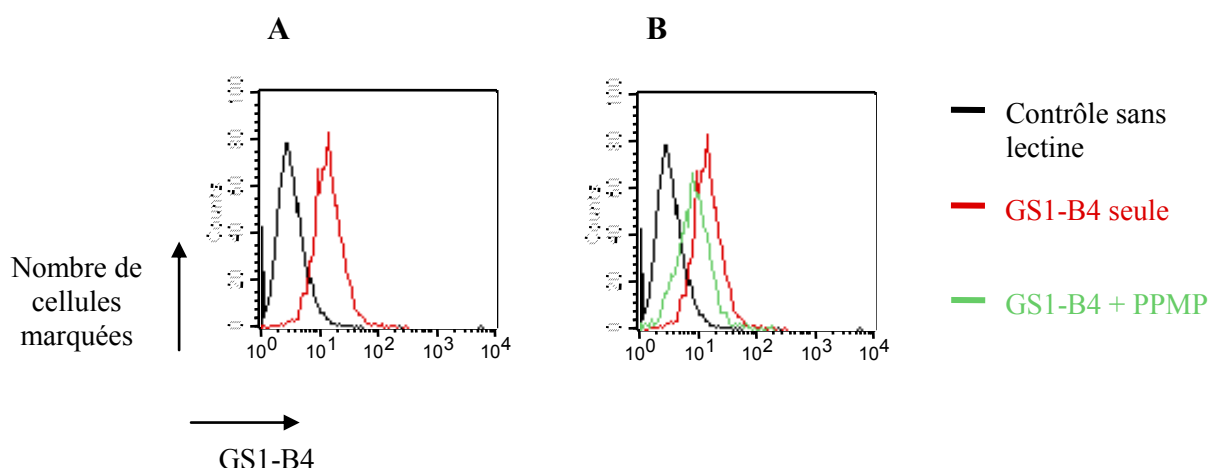


Figure 32 : Fixation de la lectine GS1-B4 à la surface de cellules HEK293. **A** : lectine seule ; **B** : lectine + PPMP. Le marquage avec la GS1-B4 après incubation des cellules pendant 48 heures avec du PPMP à une concentration de 7,5 μM (vert) est superposé au marquage avec GS1-B4 (rouge) sur des cellules non traitées.

La fixation de la lectine GS1-B4 est partiellement inhibée par un traitement des cellules avec le PPMP (40% d'inhibition). L'action limitée du PPMP sur ces cellules pourrait s'expliquer par la diminution de l'efficacité du réactif ou bien par l'expression à la surface de ces cellules de glycolipides et de glycoprotéines reconnues par GS1-B4.

Il semble donc qu'un glycolipide présentant un galactose terminal en liaison $\alpha 1,3$ soit présent à la surface de ces cellules.

Les contrôles de spécificité de la lectine par une coincubation avec du Gal libre ou par l'action des α galactosidases n'ont pas pu être réalisés sur ces cellules. En effet, avant d'avoir effectué ces essais, nous avons épuisé notre stock de lectine GS1-B4. Les nouveaux lots de lectine obtenus n'étaient pas parfaitement purs (présence de l'isolectine A, spécifique des résidus GalNAc terminaux) (GS1-B4 biotinylée ; Invitrogen) ou trop biotinylés (GS1-B4 biotinylée ; Vector), ce qui entraînait un marquage non spécifique des cellules. Cependant, la spécificité de la lectine ayant été confirmée sur les cellules HeLa-CD1d, on considère que les cellules HEK293 expriment un antigène glycolipidique qui pourrait être l'iGb3.

Contrairement aux cellules HeLa-CD1d, nous ne disposons pas au laboratoire de cellules HEK293 exprimant le CD1d à leur surface. Afin d'étudier la reconnaissance de ces cellules par les NKTi, nous induisons donc l'expression du CD1d à la surface des cellules.

- Induction de l'expression de CD1d dans les cellules HEK293

L'ADNc du CD1d humain est sous cloné dans le vecteur pCR3.1⁺ (Invitrogen). Les cellules HEK293 sont ensuite transfectées par lipofection avec le plasmide pCR3.1⁺ avec ou sans l'ADNc de CD1d. La transfection transitoire ne permettant pas l'utilisation des cellules pour les tests fonctionnels avec les lymphocytes NK_{Ti}, nous réalisons une transfection stable, par sélection des cellules avec la néomycine. Après 24 jours de sélection, on obtient une population HEK 293-CD1d hétérogène quant à l'expression du CD1d à leur surface. On réalise donc un clonage par dilution limite qui permet d'isoler des populations clonales exprimant le CD1d de façon homogène à leur surface. En parallèle, nous clonons également les HEK-pCR3.1⁺ vide pour contrôler l'effet du vecteur vide sur les cellules. Les clones de transfection utilisés par la suite sont HEK-pCR3.1⁺ clone 4 et HEK-CD1d clone 6.

c/ Les cellules Namalwa

- Caractérisation phénotypique des cellules Namalwa

La lignée Namalwa nous a été donnée par Joëlle Wiels (CNRS, Villejuif), et a été établie à partir d'un lymphome de Burkitt. L'analyse de ces cellules avec GS1-B4 ne montre aucune fixation de la lectine (Figure 33).

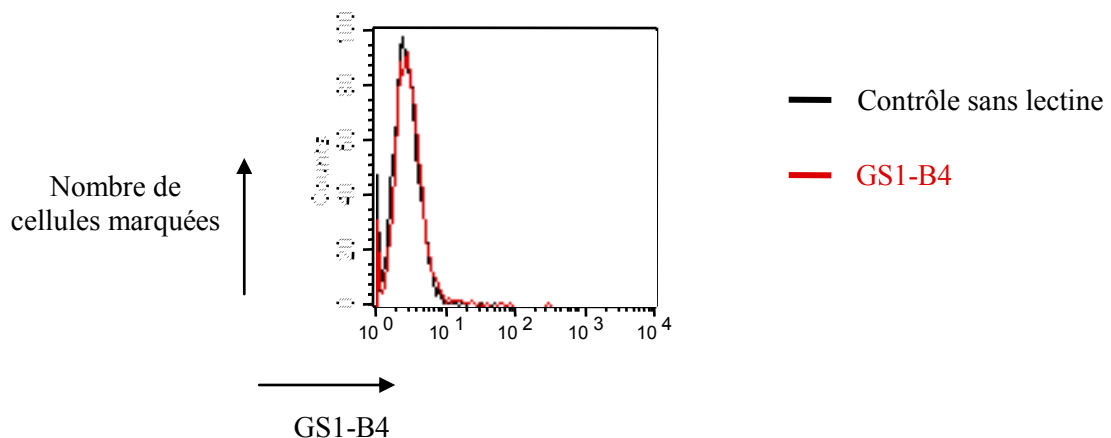


Figure 33 : Fixation de la lectine GS1-B4 sur les cellules Namalwa.

Il semble que les cellules Namalwa n'expriment pas le ligand hypothétique reconnu par la lectine GS1-B4. Une étude plus approfondie peut néanmoins être intéressante pour

discriminer la réponse des NKTi contre des cellules fixant ou non la lectine GS1-B4. Les Namalwa n'expriment pas le CD1d, il est donc nécessaire d'induire son expression dans ces cellules.

- Induction de l'expression de CD1d dans les cellules Namalwa

Dans un premier temps, la même stratégie que celle utilisée pour les cellules HEK293 est mise en œuvre. Les Namalwa sont transfectées avec le pCR3.1⁺-CD1d par choc au phosphate de calcium. Après 48 heures, 93% des cellules transfectées expriment le CD1d à leur surface. Mais, après sélection antibiotique, toutes les cellules meurent. On pense donc que les cellules n'intègrent pas le plasmide.

Une nouvelle stratégie est adoptée. L'ADNc de CD1d est cloné dans le plasmide plentiSffv, permettant la production de particules virales. Les cellules sont ensuite infectées avec trois MOI (multiplicité d'infection) différentes : 10, 5, ou 1 particules virales pour 1 cellule Namalwa. Après 14 jours, 50% des cellules infectées avec une MOI de 10 expriment le CD1d à leur surface. Un tri des cellules sur billes magnétiques est réalisé pour obtenir une population homogène quant à l'expression du CD1d. Le tri est efficace car 98% des cellules triées expriment le CD1d à leur surface.

d/ Les cellules HD Mar

La lignée HD Mar a été établie à partir d'une effusion pleurale d'un patient ayant un lymphome de Hodgkin. L'expression de CD1d à leur surface et la fixation de la lectine GS1-B4 sur ces cellules ont été étudiées (Figure 34).

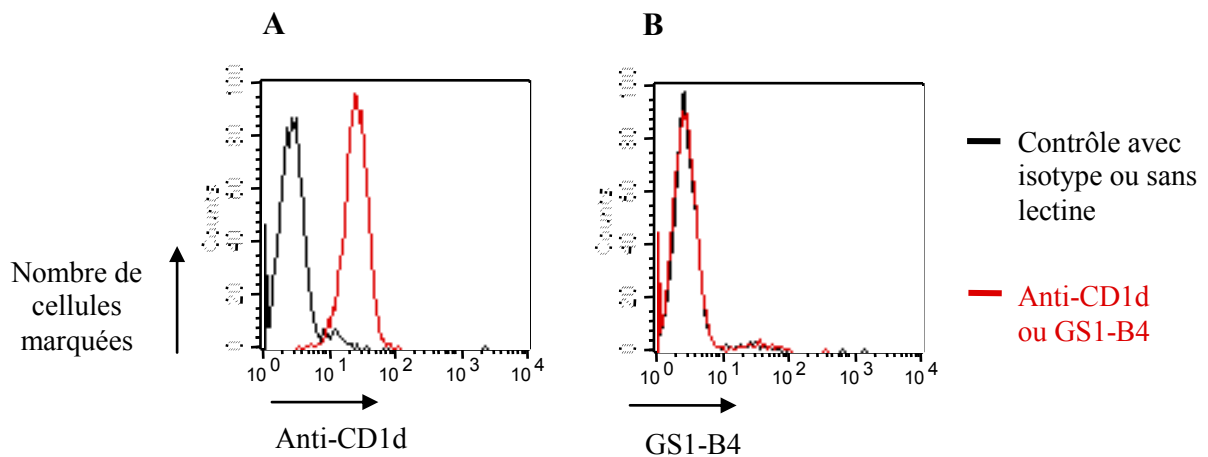


Figure 34 : Marquage membranaire de cellules HD Mar. **A :** Marquage des cellules avec l’anti-CD1d 51.1. **B :** fixation de la lectine GS1-B4.

Ces cellules expriment le CD1d (Figure 34 A) et ne fixent pas la lectine GS1-B4 à leur surface (Figure 34 B). La lignée HD Mar constitue donc un second modèle de cellules tumorales, en plus des Namalwa, n’exprimant pas l’antigène reconnu par la lectine GS1-B4. L’intérêt particulier de ces cellules se situe dans le fait qu’elles expriment naturellement le CD1d, elles peuvent donc être reconnues, *in vivo*, par les NKTi si elles présentent un glycolipide antigénique.

e/ Autres lignées tumorales

Dans le cadre de l’étude de la réponse des cellules NKTi au contact de lignées tumorales, nous avons testé un panel de lignées d’origine épithéliale quant à la fixation de la lectine GS1-B4 à leur surface (Tableau 21). Aucun marquage avec la lectine GS1-B4 ou avec l’anti-CD1d sur ces cellules n’a été observé. Nous n’avons donc pas étudié plus en détail ces lignées.

Lignée	Type de cancer	Caractéristiques	GS1-B4	CD1d
HCT-8R	iléon	épithéliales	-	-
HRT-8	rectum	épithéliales	-	-
LS174T	colon	épithéliales	-	-
Méso3	adénocarcinome	épithéliales	-	ND
Méso72	adénocarcinome	épithéliales	-	ND
SW1116	colon	en suspension	-	-
SW1220	colon	épithéliales	-	-
SW48	colon	épithéliales	-	-
SW620	colon	épithéliales	-	-
SW707-	colon	épithéliales	-	-

Tableau 17 : Recherche de l'expression d'un ligand de la lectine GS1-B4 et du CD1d sur des lignées d'origine épithéliales. ND : Non Déterminé.

L'étude de ces lignées tumorales a été réalisée avec une lectine GS1-B4 directement couplée au fluorochrome FITC. Ce n'est pas la même lectine que celle utilisée lors des marquages des autres lignées établies qui était elle couplée à un groupement biotine permettant une amplification du signal par un marquage secondaire. Pour gagner en sensibilité, il serait intéressant de reproduire ces marquages avec une lectine biotinylée, mais nous n'en trouvons plus en vente comme nous l'avons précisé plus haut.

f/ Bilan des cellules utilisées dans notre étude des NKTi

Les lignées utilisées dans notre étude et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau 18.

Lignée	Caractéristiques des cellules	GS1-B4	Ag reconnu par GS1-B4	CD1d
HeLa	épithéliales	+	Gal α 3,6 sur un glycolipide*	-
HeLa-CD1d	épithéliales, transfectées	+	Gal α 3,6 sur un glycolipide*	+
HEK	épithéliales	+	glycolipide	-
HEK-CD1d	épithéliales, transfectées	+	glycolipide	+
Namalwa	lymphoïdes	-	/	-
Namalwa-CD1d	lymphoïdes, infectées	-	/	+
HD Mar	lymphoïdes	-	/	+

Tableau 18 : Bilan des lignées étudiées dans les tests fonctionnels avec les NKTi. * La position α 3 ou α 6 du galactose est déduite de son clivage par la galactosidase recombinante d'*E. coli* qui est α 3, 6 spécifique. La nature glycolipidique de l'antigène reconnu a été déterminée par le traitement avec le PPMP.

Nous disposons donc de quatre lignées tumorales différentes, exprimant ou non le CD1d. L'expression de l'ARN messenger de l'iGb3 synthase a été étudiée et l'exon 5 est présent dans les quatre lignées. Cependant, il est possible que l'ARN messenger ne soit majoritairement pas épissé et que l'enzyme fonctionnelle ne soit présente que dans les cellules fixant la lectine GS1-B4. Par ailleurs, la présence de l'ARN messenger dans les cellules ne présage en rien de la synthèse de l'antigène, comme nous l'avons observé pour l'antigène B (article 1 de cette thèse). En effet, les cellules intestinales expriment l'antigène H à leur surface, possèdent un ARN messenger codant pour la glycosyltransférase B, mais ne synthétisent pas l'antigène B.

Des lignées cellulaires tumorales aux caractéristiques différentes ont été sélectionnées. Leur potentiel d'activation des cellules NKTi va maintenant être étudié.

2- Etude de l'interaction des NKTi avec des lignées tumorales

Des lignées tumorales reconnues (HeLa et HEK293) ou non (Namalwa et HD Mar) par la lectine GS1-B4 exprimant le CD1d sont disponibles. Dans l'hypothèse où l'antigène fixant la lectine GS1-B4 serait l'iGb3, la reconnaissance des lignées tumorales par les cellules NKTi est évaluée.

L'étude des cellules NKTi nécessite une stimulation non spécifique des lymphocytes à intervalles réguliers. Néanmoins, un même clone peut répondre différemment à deux stimulations. Par exemple, les NKTi peuvent proliférer jusqu'à 3 semaines ou entrer en apoptose 2 semaines après la stimulation. Cet aspect a été constaté par plusieurs personnes de notre laboratoire, et nous supposons qu'un changement du mode de préparation du sang par l'établissement français du sang serait la cause de ce problème. Les difficultés de culture des clones NKTi expliquent que selon les tests fonctionnels, ce ne sont pas toujours les mêmes populations qui sont présentées. De même, le niveau d'expression cytokinique pour chaque population varie en fonction du stade de culture des cellules. C'est pourquoi, dans les tests fonctionnels, nous présentons toujours un contrôle de stimulation non spécifique des NKTi (PHA) et/ou une stimulation spécifique par les HeLa-CD1d chargées avec le KRN70000.

Dans un premier temps, nous nous attachons à l'activation des cellules NKTi par des lignées reconnues par la lectine GS1-B4 : HeLa-CD1d et HEK-CD1d (Figure 35).

A

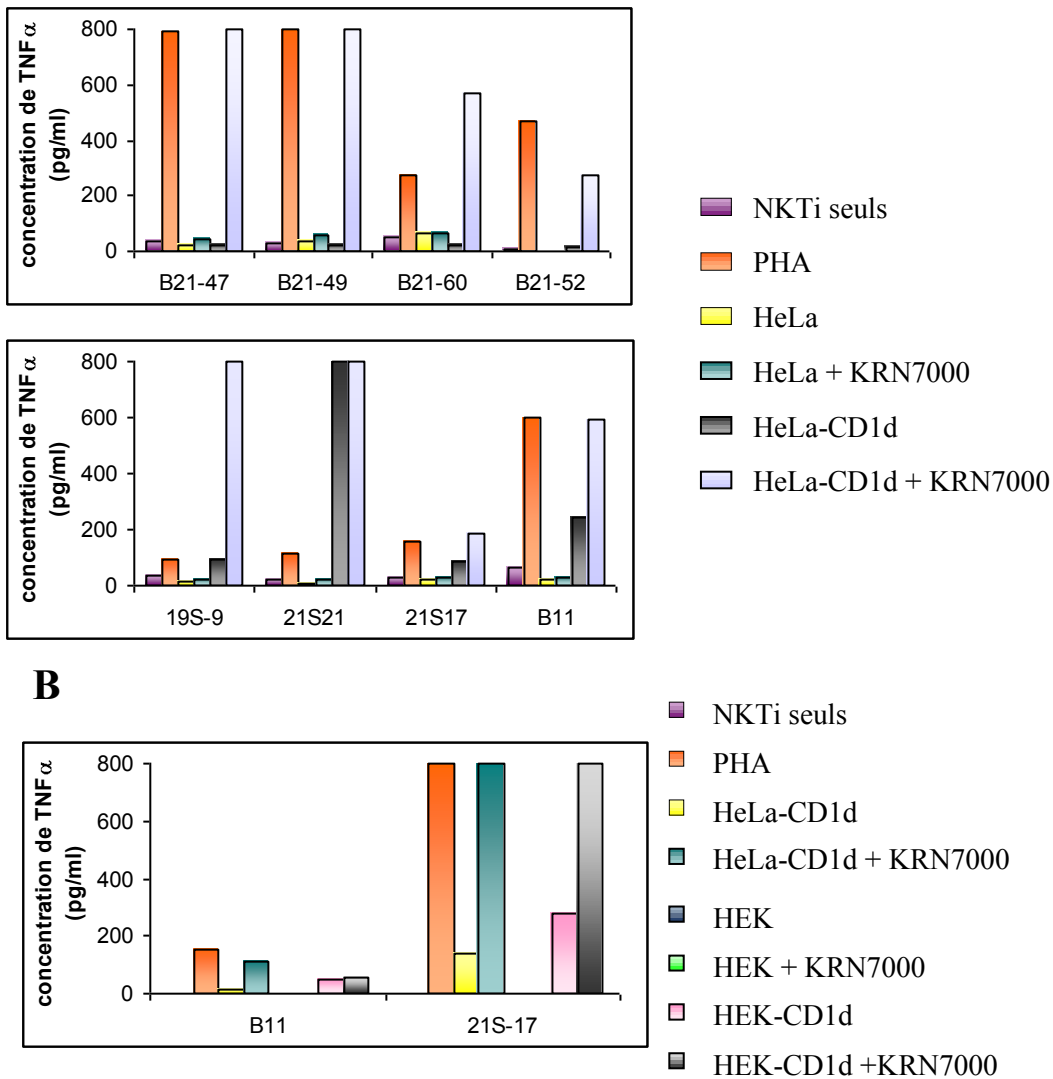


Figure 35 : Production de TNF- α par les NKTi au contact de cellules HeLa (A) ou HEK293 (B) exprimant ou non le CD1d, en présence ou non de KRN7000. Le glycolipide est chargé sur les cellules HeLa-CD1d ou HEK-CD1d par une coincubation de 16 heures.

Ces tests sont réalisés avec des clones de NKTi isolés par dilution limite à partir d'une population polyclonale. La stimulation des NKTi par les cellules HeLa-CD1d (figure 35 A) permet de distinguer deux sous groupes : les NKTi autoréactifs qui réagissent en absence de stimulation exogène par le KRN7000 (21S-21, 21S-17, 19S-9, B11), et les NKTi non autoréactifs qui ne sont stimulés que par les HeLa-CD1d chargées avec le KRN7000 (B21-47, B21-49, B21-60 et B2152). Ces clones sont issus de donneurs différents, donc il ne semble pas que cette autoréactivité soit une caractéristique particulière d'un donneur.

Lors de l'étude des cellules HEK-CD1d (figure 35 B), les NKTi B11 montrent une réactivité très faible en présence de PHA ou après stimulation par les HeLa-CD1d en présence de KRN7000. Cependant, les résultats semblent interprétables. En effet, les deux clones NKTi B11 et 21S-21 sécrètent du TNF- α en réponse à une stimulation par les HEK-CD1d, en présence ou non de KRN7000. De plus, les deux clones synthétisent plus de TNF- α après stimulation par les HEK-CD1d plutôt que par les HeLa-CD1d. Cependant, les résultats obtenus avec les HEK-CD1d sont à considérer avec prudence car nous n'avons pas étudié l'activation des NKTi non autoréactifs par ces cellules.

L'activation des NKTi autoréactifs par les cellules HeLa-CD1d et HEK-CD1d, en absence de KRN7000, laisse supposer qu'elles expriment le ligand endogène de ces NKTi. L'analyse par cytométrie en flux a montré une fixation de la lectine GS1-B4 sur un glycolipide présentant un Gal en liaison α 1,3 à la surface de ces cellules. Par ailleurs, Zhou et ses collaborateurs ont montré une reconnaissance de l'iGb3 par la lectine GS1-B4 dans le contexte du CD1d (Zhou et al., 2004b). Il est donc possible que le même antigène soit reconnu par la lectine GS1-B4 et par les NKTi.

Ensuite, nous nous intéressons aux cellules tumorales HD Mar et Namalwa-CD1d qui ne fixent pas la lectine GS1-B4 (Figure 36).

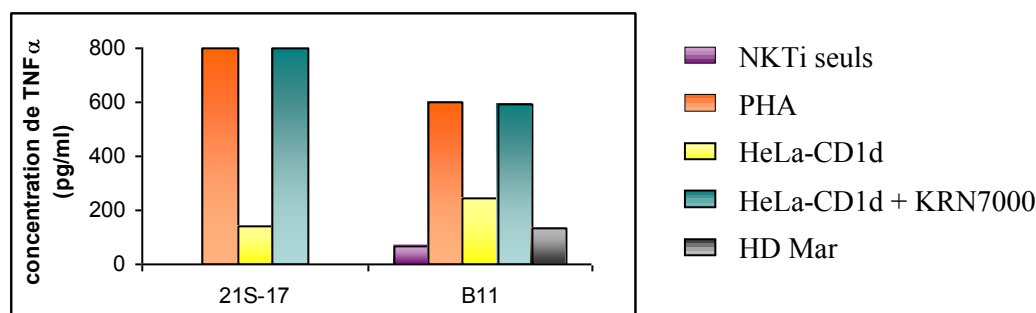
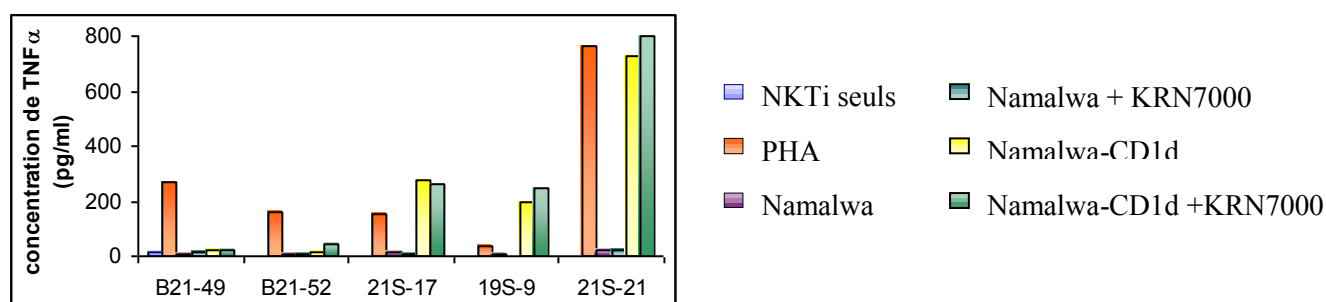
A**B**

Figure 36 : Production de TNF- α par les NKTi au contact de cellules HeLa, HD Mar (A) ou Namalwa exprimant ou non le CD1d, en présence ou non de KRN7000 (B). Le glycolipide est chargé sur les cellules cibles par une co-incubation de 16 heures.

La lignée HD Mar est reconnue par le clone NKTi B11 (figure 36 A). Ces cellules expriment naturellement le CD1d. Donc *in vivo*, elles peuvent être la cible des NKTi. La production de TNF- α par le clone B11 en réponse aux HD Mar est plus faible que par rapport aux HeLa-CD1d. Par contre, le clone NKTi 21S-17 ne reconnaît pas ces cellules. Il semblerait donc que les B11 et 21S-17 ne présentent pas la même spécificité antigénique, alors même qu'ils reconnaissent tous deux les HeLa-CD1d. Une explication à cette différence pourrait être la quantité de ligand présent à la surface de la cellule. Les cellules HD Mar exprimeraient le ligand en plus faible quantité par rapport aux HeLa-CD1d et aux HEK-CD1d, ce qui permettrait l'activation des NKTi les plus affins uniquement. De même que pour les HEK-CD1d, l'interaction des HD Mar avec les NKTi non autoréactifs reste à évaluer.

Les Namalwa-CD1d sont reconnues par tous les NKTi autoréactifs (figure 36 B). Les NKTi non autoréactifs ne sont pas stimulés par ces cellules en présence ou non de KRN7000. Pourtant, l'incubation de B21-49 et B21-52 avec la PHA permet une production de TNF- α

équivalente à celle obtenue pour les NKTi 21S-17 dans les mêmes conditions. De plus, dans cette même expérience, des cellules CHO (cellules ovariennes de cochon d'Inde) exprimant le CD1d chargées avec le KRN7000 activent les NKTi B21-49 et B21-52 qui sécrètent alors plus de TNF- α qu'en présence de PHA (résultats non présentés). Il semble donc que ni l'absence d'expression du CD1d, ni une mauvaise solubilisation du KRN7000 dans le milieu de culture ne puisse expliquer l'absence d'activation des NKTi B21-49 et B21-52 par les cellules Namalwa-CD1d en présence de KRN7000. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

- les NKTi autoréactifs sécrètent la même quantité de TNF- α en présence ou non de KRN7000. Il semble donc que la stimulation maximale des NKTi autoréactifs est obtenue au contact des Namalwa-CD1d seules. On peut donc penser que tous les sites CD1d sont saturés avec l'antigène endogène, ce qui ne permet pas le chargement de KRN7000, et donc l'activation des NKTi non autoréactifs.
- l'absence d'activation des NKTi non autoréactifs par les Namalwa-CD1d en présence de KRN7000 pourrait également s'expliquer, non pas par une absence de chargement de la molécule, mais par une incapacité des cellules à apprêter correctement l'antigène exogène pour le chargement dans le sillon de CD1d.

A la vue de ces résultats sur l'interaction entre les NKTi autoréactifs et les cellules tumorales, il semble qu'il existe un profil d'activation différent selon les lignées utilisées. La corrélation entre la reconnaissance des cellules cibles par la lectine GS1-B4 et le potentiel d'activation des clones NKTi autoréactifs n'a pas pu être établie. Cependant, il est possible que plusieurs antigènes endogènes soient impliqués dans l'activation des NKTi, l'iGb3 pourrait être un de ceux là, sans être le seul.

Une autre explication du profil d'activation des NKTi autoréactifs par les lignées tumorales serait l'expression d'un même antigène endogène par toutes ces cellules tumorales, non reconnu par la lectine GS1-B4. Dans ce cas, la corrélation entre l'expression de l'antigène endogène et l'activation des NKTi peut être visualisée dans la figure 37.

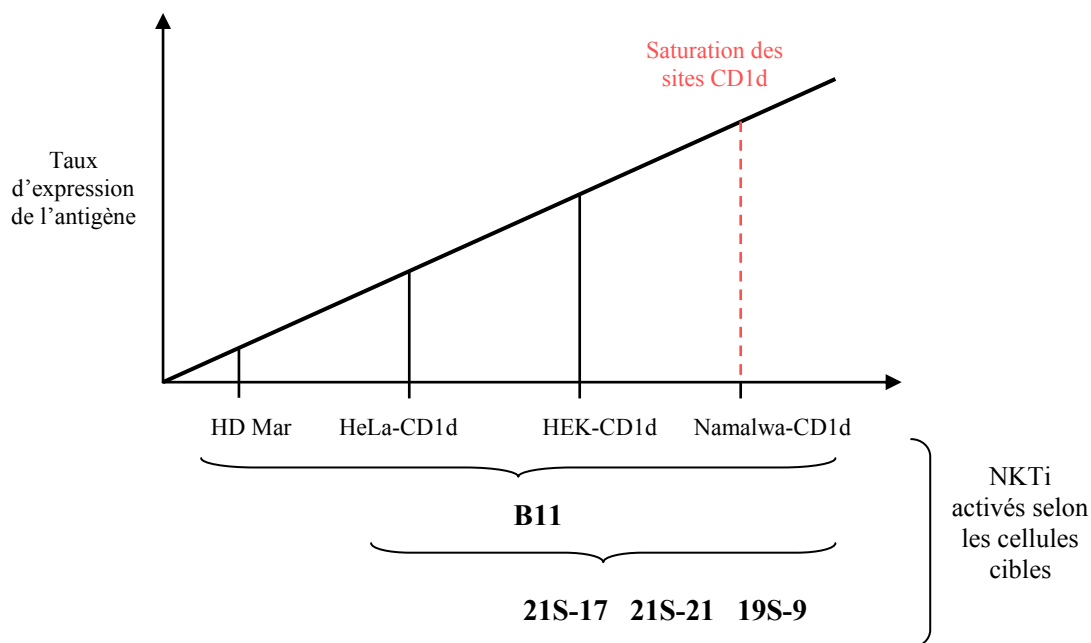


Figure 37 : Relation hypothétique entre l'expression d'un ligand endogène dans les cellules tumorales et sa capacité à activer des NKTi autoréactifs

En ce qui concerne les clones NKTi non autoréactifs, leur activation par les cellules tumorales uniquement en présence de KRN7000 pourrait s'expliquer par leur spécificité particulière, plutôt dirigée vers un antigène bactérien (voir plus loin).

D-Interaction des NKTi avec les cellules dendritiques

1- Production et caractérisation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes impliquées dans l'activation des cellules NKTi et dans leur fonction immunitaire. Elles sont issues de monocytes différenciés sous l'effet de cytokines spécifiques. Les monocytes sont obtenus en grande quantité grâce à leur purification sur gradient de densité à partir de résidus de couches leucoplaquettaires riches en cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et dépourvus de plaquettes, fournis par l'établissement français du sang (EFS) de Nantes

Après purification, les monocytes sont différenciés en cellules dendritiques immatures (DCi) en 5 jours pour être ensuite maturés. A J7, la maturation correcte des DCi est contrôlée

par l'analyse par cytométrie en flux de trois marqueurs de maturation : CD80, CD83 et CD86, surexprimés dans les cellules dendritiques matures (DCm) (Figure 38).

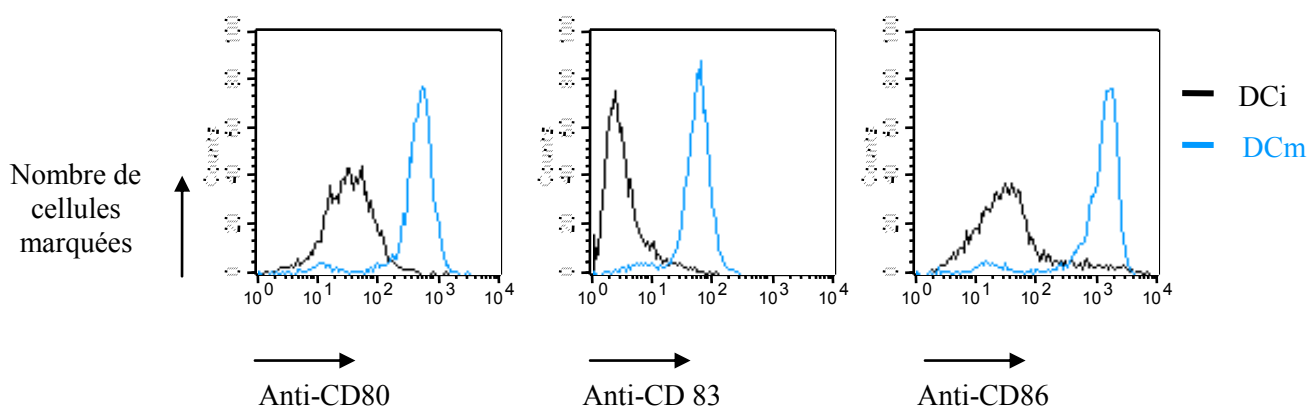


Figure 38 : Marquage membranaire de CD80, CD83, et CD86 sur des cellules dendritiques matures (noir) et immatures (bleu) produites à partir de monocytes de l'individu 34. Les marquages avec les contrôles isotypiques ne sont pas représentés mais étaient parfaitement superposables entre les cellules dendritiques immatures et matures.

Les caractéristiques des DC dépendent de l'individu donneur. En vue de l'étude de l'expression de l'iGb3 chez l'Homme, nous avons réalisé un marquage des DC avec la lectine GS1-B4, chez plusieurs donneurs. Il semble que le profil de fixation de la lectine GS1-B4 varie en fonction non seulement du donneur mais aussi du stade de maturation des cellules. Cependant, ces résultats sont préliminaires et sont à confirmer. Le contrôle de la spécificité de fixation de la lectine sur l'individu 34 a été réalisé par une coincubation avec 100 mM de Gal (Figure 39).

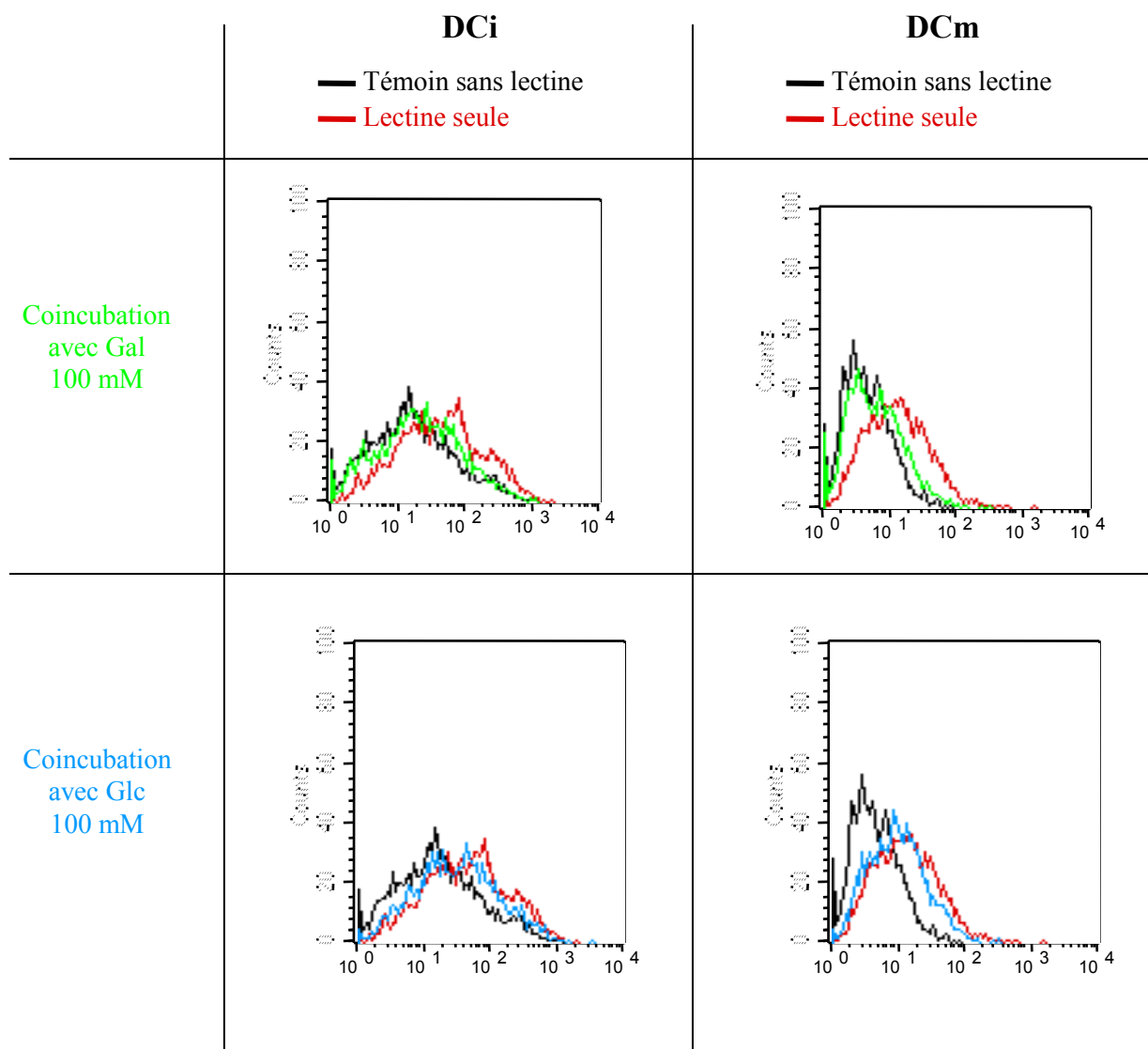


Figure 39 : Inhibition de la fixation de la lectine GS1-B4 (rouge) sur les DC issus du donneur 34 par 100 mM de Gal (vert) ou Glc (bleu) libre. Le marquage des DC immatures est représenté à gauche, et des DC matures à droite.

Nous ne pouvons pas identifier plus précisément l'antigène reconnu par GS1-B4 sur ces cellules. En effet, l'utilisation du PPMP dans nos conditions altère la maturation des DC, et l'action des galactosidases nécessite une incubation dans du tampon cacodylate qui tue les cellules.

L'ARN messager de l'iGb3 synthase est exprimé dans les DC de façon similaire aux lignées tumorales. L'amplification de l'exon 5 est possible, mais le clonage de l'ADNc complet de l'iGb3 synthase a échoué comme à partir des lignées tumorales.

Afin de déterminer si oui ou non l'iGb3 est synthétisé dans ces cellules, une collaboration avec M. Palcic (Danemark) a été mise en place. Des culots de DCi et DCm lui ont été fournis et l'activité enzymatique iGb3 synthase a été étudiée dans ces cellules. Les premiers résultats préliminaires sont montrés dans le tableau 19.

	DCi	DCm
Substrat		
GlcNAc-R ^a	120 848	138 141
LacNAc-R ^b	162 889	123 488
Lac-R ^c	182	212

Tableau 19 : Mesure du transfert de galactose à partir d'UDP-Gal marqué au C¹⁴ sur des substrats, par les protéines extraites de DCi ou de DCm (en nombre de coups par minute).
^a correspond aux activités β 1,3/4-galactosyltransférase ; ^b correspond à l'activité α 1,4-galactosyltransférase ; ^c correspond à l'activité iGb3 synthase. R : (CH₂)₈CO₂CH₃. Le bruit de fond moyen de 1000 cpm a été déduit.

Il ne semble pas y avoir d'activité iGb3 synthase, mais il faudra utiliser du lactosylcéramide comme accepteur et tester des DC issues d'autres donneurs. Le produit de la réaction sur le LacNAc devra être caractérisé. Il pourrait correspondre à une forte activité Gb3 synthase.

La présence d'un antigène reconnu par la lectine GS1-B4 sur des cellules normales humaine est assez surprenante. En effet, nombre d'études ont été réalisées avec la lectine GS1-B4 et n'ont montré aucun marquage sur des cellules normales. Les cellules dendritiques ayant un rôle central dans le fonctionnement du système immunitaire, nous nous interrogeons sur la réactivité des lymphocytes NKTi vis-à-vis de DC aux profils si différents.

2- Etude de l'interaction des NKTi avec les cellules dendritiques

Etant donné le profil de fixation de la lectine sur les DC, il semble intéressant de déterminer la réactivité des NKTi vis-à-vis de ces cellules, en présence ou non de KRN7000. Cette étude a été réalisée sur les DC produites à partir du donneur 34.

Les DC sont produites comme décrit précédemment et la maturation est contrôlée avant le test fonctionnel à J7. Ensuite, les DC sont incubées 16 heures avec ou sans KRN7000, dans les mêmes conditions que les cellules tumorales. Enfin, chaque clone est au contact des cellules cibles (DC ou HeLa-CD1d) pendant 6 heures et la production de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL-4 est évaluée.

Dans un premier temps, les clones non autoréactifs sont testés (Figure 40).

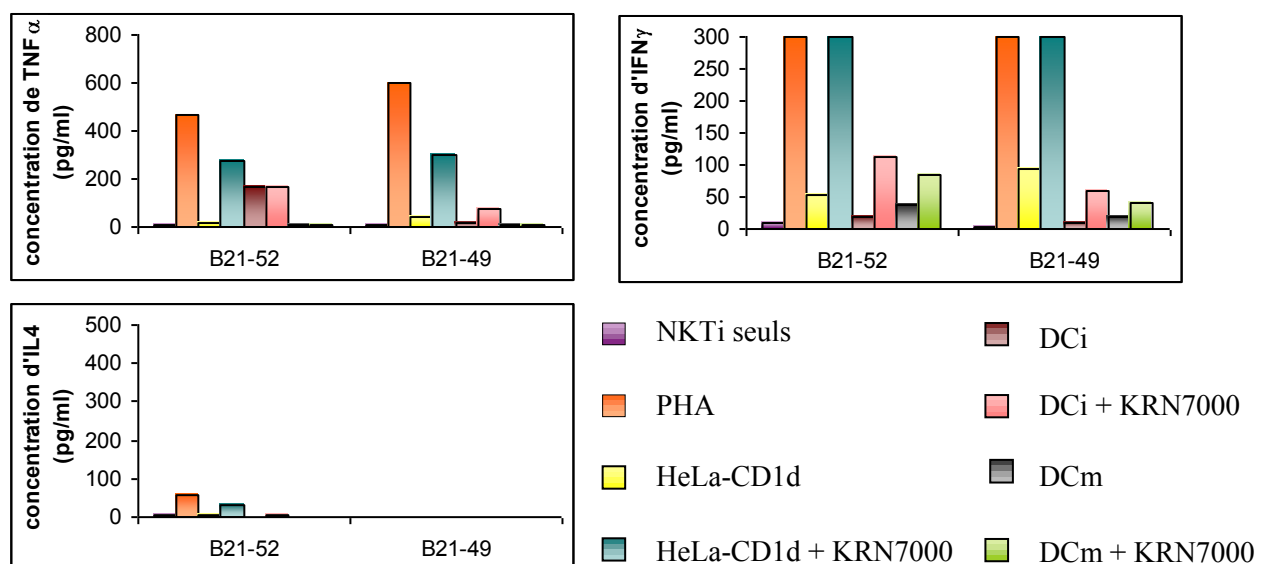


Figure 40 : Production de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL4 par les NKTi non autoréactifs B21-49 et B21-52 au contact de cellules HeLa-CD1d ou de cellules dendritiques matures et immatures de l'individu 34 en présence ou non de KRN7000. Après vérification de la maturation par cytométrie en flux, les DC sont incubées avec le glycolipide pendant 16 heures pour le chargement du KRN7000.

Les deux clones non autoréactifs ne produisent pas d'IL4 au contact des cellules tumorales chargées avec le KRN7000 alors qu'on observe une production de TNF- α et d'IFN- γ . L'incubation avec les cellules dendritiques, en présence ou non de KRN7000, est à

l'origine d'un profil cytokinique variable selon les clones. Les clones non autoréactifs ont été obtenus par la stimulation de PBL totaux avec des cellules dendritiques chargées avec l'antigène mycobactérien PIM₄ ce qui pourrait expliquer l'orientation de la production cytokinique vers un profil Th1 après reconnaissance du KRN7000 par ces NKTi non autoréactifs (Fischer et al., 2004).

Dans un deuxième temps, l'activation des clones NKTi autoréactifs par les DC est évaluée (Figure 41).

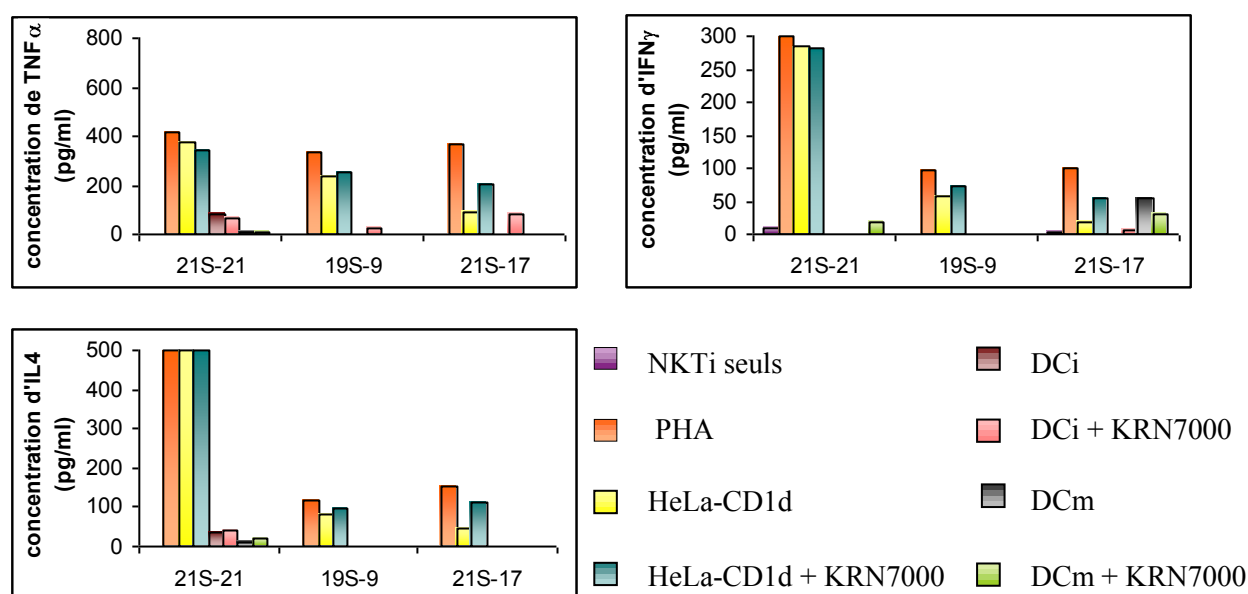


Figure 41 : Production de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL4 par les NKTi autoréactifs 19S-9, 21S17 et 21S-21 au contact de cellules HeLa-CD1d ou de cellules dendritiques matures et immatures de l'individu 34 en présence ou non de KRN7000. Après vérification de la maturation par cytométrie en flux, les DC sont incubées avec le glycolipide pendant 16 heures pour le chargement du KRN7000.

Les trois clones NKTi autoréactifs étudiés sécrètent du TNF- α , de l'IFN- γ et de l'IL-4, même si la quantité d'IL4 et d'IFN- γ produite par les NKTi 19S-9 et 21S-17 est plus faible que celle produite par le clone NKTi 21S-21. Au contact de cellules tumorales HeLa-CD1d chargées avec les KRN7000, les trois cytokines sont produites à un niveau équivalent à celui obtenu lors de la stimulation non spécifique par la PHA. Les profils d'expression cytokiniques des NKTi autoréactifs au contact de DC sont très variables selon les clones.

Un profil « type » de sécrétion cytokinique peut difficilement être présenté dans le cas du contact des DC avec les NKTi. L'étude de la réactivité des NKTi contre les DC devra être approfondie. Les DC sont les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles chez l'Homme et jouent un rôle central dans l'activation des NKTi. Leur aptitude à présenter un antigène endogène aux NKTi est cruciale pour la mise en place de leur activité, puis pour l'activation des autres membres du système immunitaire.

II- Existe-t-il une population lymphocytaire humaine spécifique de l'iGb3 ?

C- Reconnaissance de l'iGb3 chargé sur des cellules cibles

Des cellules HeLa-CD1d ont été incubées avec le glycolipide iGb3 (fourni par S. Teneberg (Göteborg, Suède), purifié à partir d'intestin de rat) à différentes concentrations dans les conditions habituelles, puis la reconnaissance par la population polyclonale NKTi MAD11 a été évaluée (Figure 42). L'utilisation de la population polyclonale NKTi MAD11 permet d'éviter le biais de reconnaissance que nous aurions en utilisant une population clonale. Cependant, si le ligand endogène iGb3 est de faible affinité, nous risquons de ne pas observer de réponse avec cette population. La reconnaissance par les NKTi MAD11 des HeLa-CD1d incubées avec de l'iGb3 a été évaluée par un test de cytotoxicité à médiation cellulaire. Si le complexe ligand-CD1d sur la cellule cible est reconnu par le NKTi, la cellule est lysée et relargue du Cr⁵¹. La radioactivité présente dans le surnageant est mesurée.

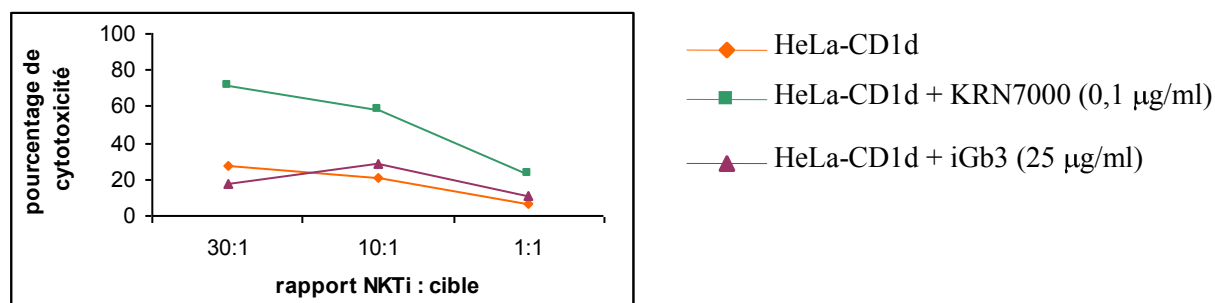
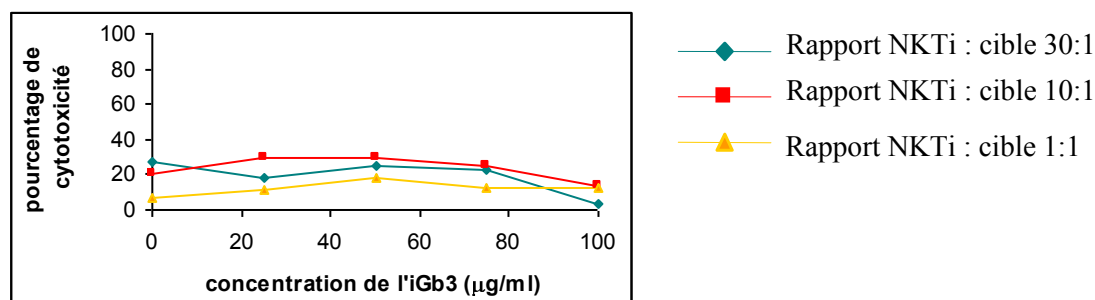
A**B**

Figure 42 : Cytotoxicité de la population polyclonale NKTi MAD11 au contact de cellules HeLa-CD1d chargées avec des concentrations variables de glycolipide iGb3. **A :** Courbe de cytotoxicité des NKTi contre les cellules cibles seules ou incubées avec 0,1 µg/ml de KRN7000 ou 25 µg/ml d'iGb3. Trois rapports effecteurs : cibles sont testés. **B :** Courbe de cytotoxicité des NKTi contre les cellules incubées avec une concentration croissante d'iGb3. Chaque courbe représente un rapport effecteurs : cibles.

Les cellules MAD11 lysent efficacement les cellules HeLa CD1d chargées avec le KRN7000, mais pas avec l'iGb3. Cependant, même si ce test permet de détecter la lyse d'une petite quantité de cellules, on peut se demander si la présence sur les cellules cibles d'un antigène de faible affinité entraînera la lyse des cellules ou plutôt la sécrétion de cytokines par les NKTi. Par ailleurs, comme précisé plus haut, une population polyclonale de NKTi n'est peut-être pas le meilleur outil pour détecter une activité dirigée contre un antigène de faible affinité, par une partie des cellules NKTi (autoréactifs par exemple).

Nous réalisons donc un test fonctionnel de reconnaissance de l'iGb3 chargé sur les cellules Hela-CD1d par la population clonale autoréactive NKTi 21S-17 (Figure 43).

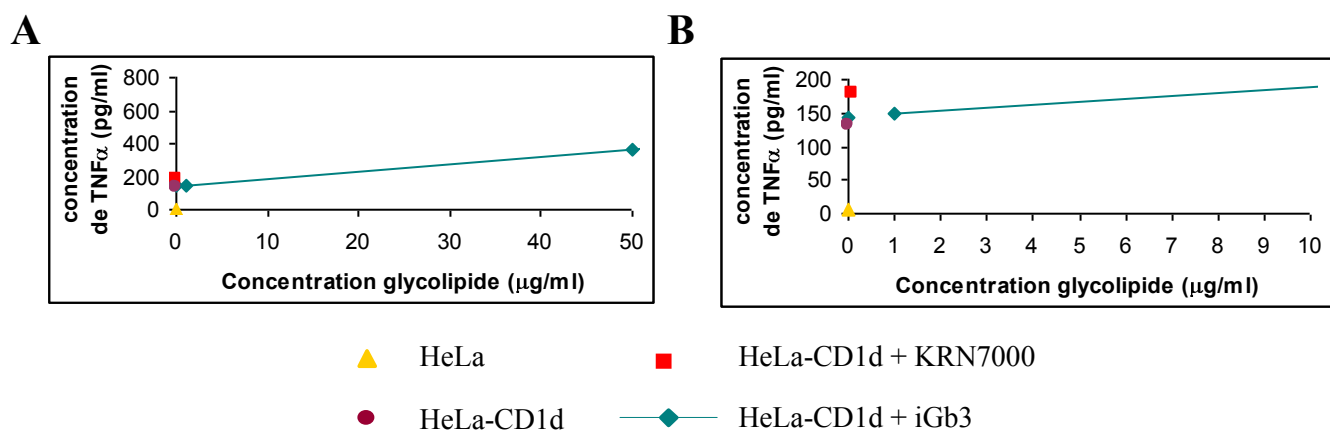


Figure 43 : Production de TNF- α par les NKTi 21S-17 au contact de cellules HeLa-CD1d en présence ou non de KRN7000 ou d'iGb3. **A :** Production de TNF- α aux différentes concentrations du glycolipide (de 0,1 à 50 $\mu\text{g/ml}$ pour iGb3 ; 0,1 $\mu\text{g/ml}$ pour KRN7000). **B :** Production de TNF- α aux faibles concentrations de glycolipide (agrandissement de la figure A).

Lors de cette expérience, les NKTi 21S-17 produisent peu de TNF- α , même en contact avec des cellules HeLa-CD1d chargées avec le KRN7000. Le KRN7000 est utilisé uniquement à une concentration de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ car nous disposons de peu de KRN7000 et nous savons qu'il est efficace à cette concentration. La concentration maximale d'iGb3 utilisée est de 50 $\mu\text{g/ml}$. Cette concentration n'est pas physiologique, mais permet de constater qu'il n'y a pas d'inhibition de la reconnaissance des HeLa CD1d par l'iGb3 présent en excès dans le surnageant. Au contraire, on constate une augmentation (faible) de la production de TNF- α en parallèle de l'augmentation de la concentration de l'iGb3. Une critique qui peut être apportée à cette expérience est l'utilisation d'un clone autoréactif. En effet, la reconnaissance par NKTi 21S-17 d'un ligand endogène des cellules HeLa-CD1d empêche peut-être l'activation maximale des NKTi par l'ajout d'un glycolipide exogène. En effet, selon les expériences, l'augmentation de la production de cytokines due à l'ajout de KRN7000 aux cellules est plus ou moins marquée. Dans ce cas, comment observer l'augmentation de production de cytokines due à un ligand de faible affinité ?

D-Inhibition de la reconnaissance des HeLa-CD1d par les NKTi

Afin de déterminer si oui ou non, l'antigène reconnu par les NKTi sur les cellules HeLa-CD1d est l'iGb3, nous cherchons à inhiber cette reconnaissance par l'utilisation d'une lectine GS1-B4 libre. La concentration de la lectine permettant l'inhibition est définie d'après l'étude de Zhou et ses collaborateurs (Zhou et al., 2004b). Plusieurs concentrations de la lectine libre sont utilisées. Le test fonctionnel est réalisé dans les mêmes conditions que précédemment, mais la lectine est coincubée avec les cellules lors du contact NKTi / cellules cibles. La production de cytokines est ensuite analysée (Figure 44).

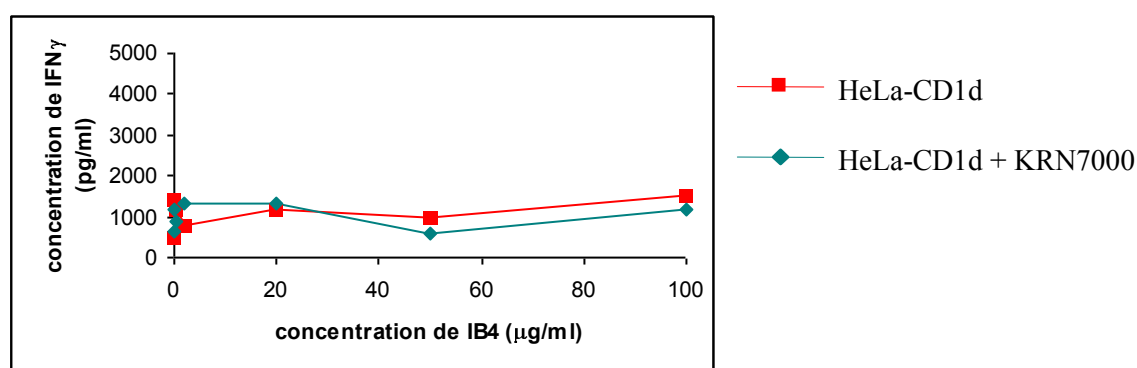


Figure 44 : Production de cytokines par les NKT 21S-21 au contact de cellules HeLa-CD1d, en présence de lectine GS1-B4 libre. Le glycolipide est chargé sur les cellules HeLa-CD1d par une coincubation de 16 heures avec les cellules cibles. La lectine GS1-B4 libre est coincubée avec les cellules lors du contact NKTi-cellules cibles, à une concentration variable.

Aucune inhibition de la production de cytokines n'est visible, quelle que soit la concentration de la lectine utilisée. Lors de son étude, Zhou constatait une diminution de la production d'IL-2 de l'ordre de 60 % en coincubant la lectine GS1-B4 à une concentration de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ avec l'iGb3, par rapport à celle obtenue suite à une incubation avec l'iGb3 seule durant le chargement des cellules cibles. Cependant, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer l'absence d'inhibition par la lectine GS1-B4 dans nos conditions.

Il est possible que l'antigène reconnu par les cellules NKT sur les HeLa-CD1d ne soit pas l'iGb3. Dans ce cas, l'inhibition de la reconnaissance avec la lectine GS1-B4 ne peut pas fonctionner. Une autre hypothèse expliquant cette absence d'inhibition serait l'inadéquation

de notre méthodologie par rapport au mode de chargement de l'antigène. En effet, Zhou et ses collaborateurs présentent une inhibition de la reconnaissance par la coincubation de la lectine libre avec les cellules exprimant le ligand endogène des cellules NKTi (Zhou et al., 2004b). Le temps d'incubation des NKTi avec les cellules cibles dans l'étude de Zhou est de 16 heures. Dans notre cas, les NKTi sont au contact des cellules cibles pendant seulement 6 heures. Si ce temps est suffisant pour la reconnaissance des cibles spécifiques des NKTi, est-il assez long pour que la lectine interfère dans cette reconnaissance ?

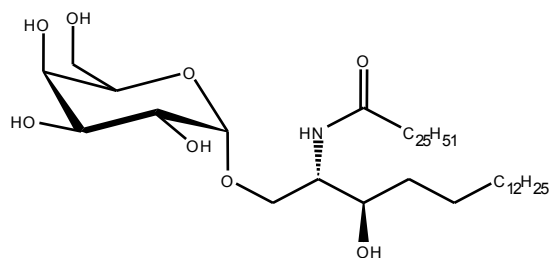
Pour conclure, nous pouvons dire que ni le chargement exogène de l'iGb3, ni l'inhibition de la reconnaissance par la lectine GS1-B4 ne nous permettent de conclure quant au statut de ligand endogène humain de l'iGb3. Au contraire, nos résultats tendent à montrer que l'iGb3 n'est pas ce ligand endogène. En effet, nous avons observé des anomalies d'épissage de l'ARNm du gène *iGb3s* chez l'Homme. De plus, il n'y a pas de corrélation évidente entre la présence d'une réactivité avec la lectine GS1-B4 et la reconnaissance de ligand endogène, et la lectine GS1-B4 n'a pas inhibé la reconnaissance du ligand endogène par les NKTi. Cependant, l'inhibition de l'activation des NKTi par des cellules dendritiques humaines coincubées avec la lectine GS1-B4 a été montrée par l'équipe d'A. Bendelac. Nous n'avons pas reproduit ce résultat avec des cellules HeLa-CD1d. Il est toutefois possible que le ligand exprimé par les HeLa-CD1d ne soit pas l'iGb3. Une étude d'inhibition de la reconnaissance des DC devra être réalisée pour valider notre démarche technique.

III- Autres ligands pour les cellules NKTi

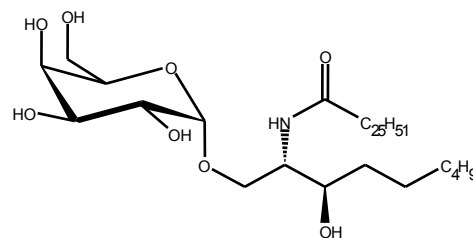
L'utilisation du KRN7000 en thérapie a donné lieu à ce jour à deux essais cliniques de phase I (Giaccone et al., 2002; Ishikawa et al., 2005). Cependant, comme on peut le constater *in vitro*, l'activation des NKTi par le KRN7000 permet une forte sécrétion de cytokines. Aussi, l'utilisation de glycolipides dérivés de KRN7000, mais activant plus modérément les NKTi ou entraînant une polarisation soit vers un profil Th1, soit vers un profil Th2 serait intéressante.

D-Agonistes synthétiques

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de chimistes de P. Dubreuil, nous avons testé la reconnaissance de cellules HeLa-CD1d chargées avec des agonistes de KRN7000 par la population polyclonale NKT MAD11. La structure des agonistes est présentée ci-dessous (Figure 45).

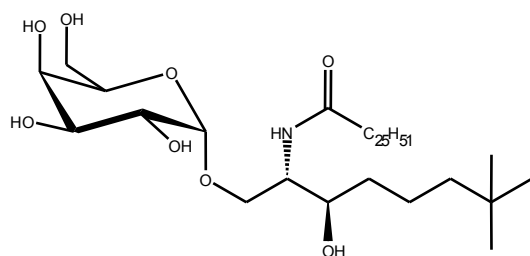


VL 335



VL 338

1 carbone de moins sur la chaîne sphingosine
par rapport au KRN7000



VL 351

Figure 45 : Structure des agonistes synthétiques de KRN7000.

La molécule VL335 est la même que KRN7000 à l'exception d'un carbone en moins sur la chaîne sphingosine. Elle est utilisée comme contrôle d'activation dans ces tests, à la place de KRN7000. Un test préliminaire a montré une réactivité équivalente des NKTi MAD11 contre les HeLa-CD1d chargées avec 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de KRN7000 ou de VL335. La réactivité de la population polyclonale NKTi MAD11 contre les cellules cibles HeLa-CD1d préincubées avec les différents glycolipides est présentée dans la figure 46.

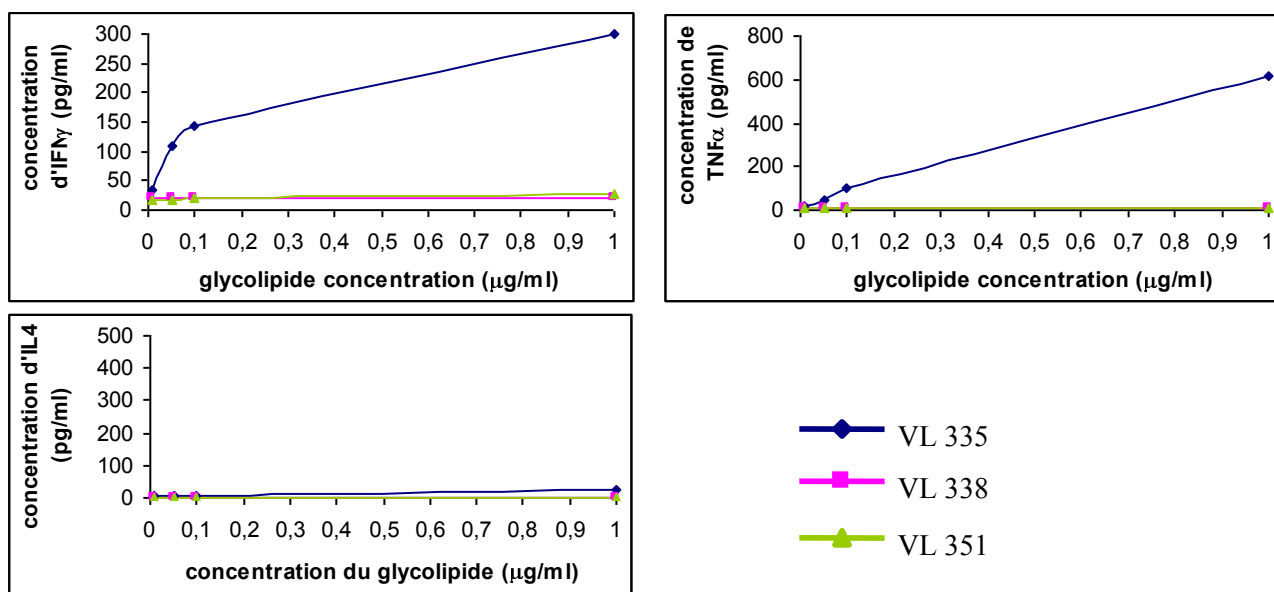


Figure 46 : Synthèse d'IFN- γ , de TNF- α , et d'IL4 par la population polyclonale NKTi MAD11, au contact d'analogues synthétiques de KRN7000. Les glycolipides à différentes concentrations sont chargés sur les cellules HeLa-CD1d par une coincubation de 16 heures.

Il semble que les modifications apportées à la molécule VL335 aient altéré sa capacité d'activation des cellules NKTi.

Ces résultats sont préliminaires et des tests complémentaires doivent être réalisés pour confirmer ces données (utilisation de clones au lieu de population polyclonales, par exemple).

E- Glycolipides marins

En parallèle, une collaboration avec l'équipe de Gilles Barnathan nous a permis de tester la reconnaissance de glycolipides marins, purifiés à partir d'algues, par les cellules NKTi. La structure de ces glycolipides est présentée dans la figure 47.

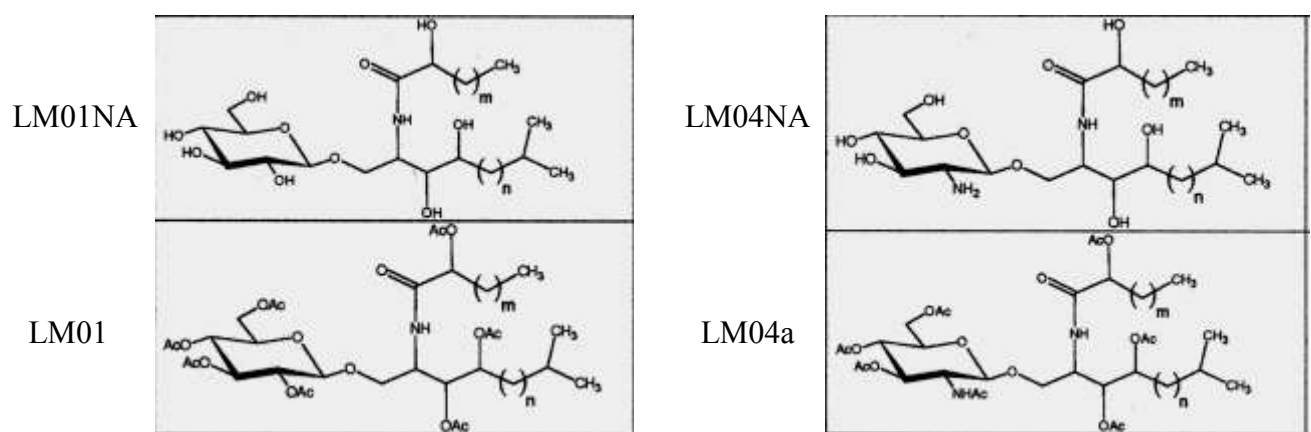


Figure 47 : Structure des glycolipides marins.

Les glycolipides LM01NA et LM04NA présentent respectivement un galactose ou une galactosamine en conformation β . LM01 et LM04a correspondent aux mêmes glycolipides sous forme acétylée. Aucun de ces glycolipides ne semble donc être un candidat privilégié pour activer les NKTi. Nous testons cependant la réactivité de la population polyclonale NKTi MAD11 contre des cellules HeLa-CD1d chargées avec différentes concentrations du glycolipide (Figure 48).

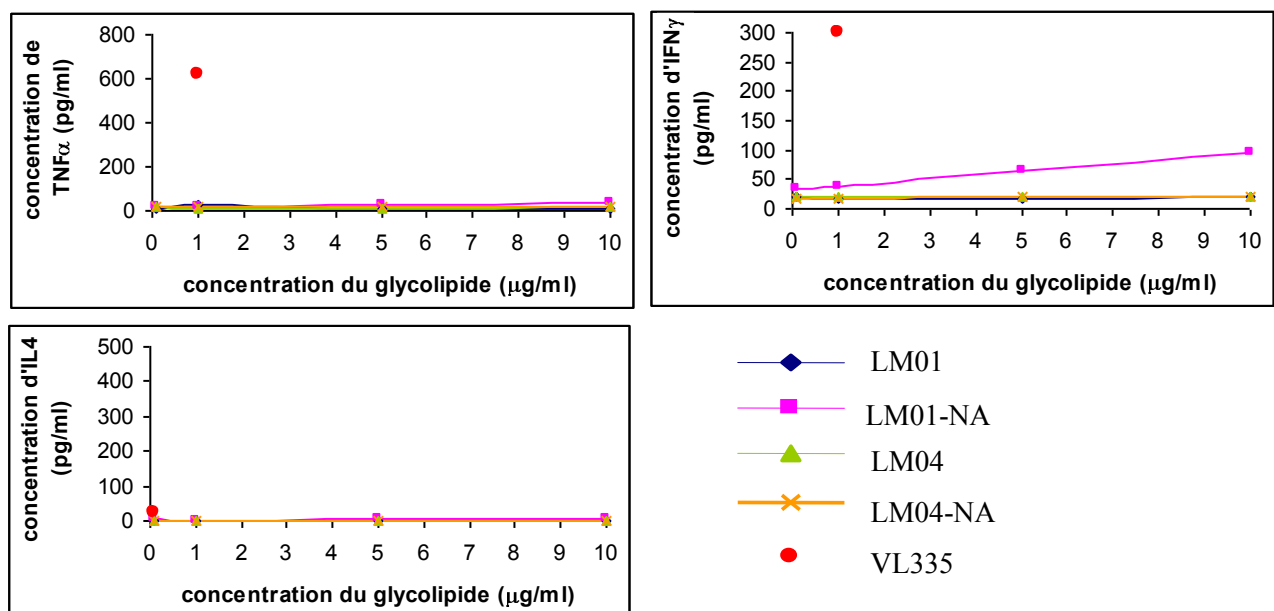


Figure 48 : Synthèse d'IFN- γ , de TNF- α , et d'IL4 par la population polyclonale NKTi MAD11, au contact de glycolipides marins. Les glycolipides à différentes concentrations sont chargés sur les cellules HeLa-CD1d par une coincubation de 16 heures avec les cellules cibles.

Dans ce test, la molécule VL335, décrite ci-dessus, est utilisée comme contrôle d'activation des NKTi. En effet, nous ne disposons plus de KRN7000 au laboratoire et la VL335 permet d'activer les NKTi au moins aussi fortement que le KRN7000. Les NKTi ne semblent pas activés par les molécules testées. Une faible sécrétion d'IFN- γ est observée en présence de LM01-NA à forte concentration (10 μ g/ml). On considère généralement que les glycolipides possédant un galactose ou un glucose en anomérie β ne sont pas des ligands reconnus par les NKTi. Cependant, Parekh et ses collaborateurs ont observé que le β -GalCer pouvait avoir une activité à forte concentration chez la souris (Parekh et al., 2004).

Conclusions et Perspectives

Les NKTi forment un sous groupe de lymphocytes aux propriétés particulières. Ils expriment à leur surface des marqueurs des cellules NK et un TCR invariant spécifique d'un antigène glycolipidique présenté à la surface des cellules présentatrices dans le contexte du CD1d. Un antigène des cellules NKTi est l' α galactosylcéramide purifié à partir d'une éponge marine. Du fait de sa structure, cet antigène ne peut pas être le ligand endogène des NKTi étant donné que chez les mammifères le premier galactose greffé sur le céramide est toujours d'anométrie β . Des antigènes bactériens ont été identifiés (PIM₄, glucuronycéramide, galacturonycéramide) (Fischer et al., 2004; Kinjo et al., 2005; Mattner et al., 2005) ainsi qu'un antigène spécifique des tumeurs (GD3) permettant une réponse NKTi orientée vers un profil Th2 (Wu et al., 2003). Il semblerait que seuls les NKTi murins reconnaissent le GD3 (De Libero and Mori, 2005). De nombreuses études ont été conduites pour identifier l'antigène endogène des cellules NKTi. Récemment, l'équipe de A. Bendelac a identifié l'iGb3 comme ligand endogène des NKTi murins, et a montré sa reconnaissance par les NKTi humains (Zhou et al., 2004b). Nous avons parallèlement commencé à nous intéresser à l'expression de l'iGb3 dans différentes lignées tumorales et dans les cellules dendritiques, ainsi qu'à la reconnaissance spécifique de ce glycolipide par les NKTi humains.

- Expression de l'iGb3 chez l'Homme

Dans un premier temps, la fixation spécifique de la lectine GS1-B4, spécifique des résidus galactose en liaison α 1,3, sur des coupes de tissus tumoraux congelés préférentiellement aux tissus inclus en paraffine nous a permis de constater qu'il existait un antigène glycolipidique présentant un galactose terminal exprimé à la surface de cellules tumorales chez l'Homme. La position α 3 de cet antigène n'a cependant pas été démontrée. La lectine GS1-B4 a été largement utilisée pour mettre en évidence l'absence d'expression du xénoantigène Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R chez l'Homme (Milland et al., 2006). L' α 1,3-galactosyltransférase transférant le résidu galactose majoritairement sur une glycoprotéine, des coupes de tumeurs incluses en paraffine ont été utilisées. Le processus d'inclusion en paraffine contribue à extraire les glycolipides. L'absence de fixation de la lectine dans ces études ne présage donc en rien de la présence ou non de l'iGb3. Lors de leur étude de souris KO pour l' α 1,3-galactosyltransférase, Milland et ses collaborateurs ont constaté qu'après une immunisation avec le xénoantigène, les souris développent des anticorps dirigés contre l' α 3 Gal, mais à un titre faible par rapport aux anticorps naturels humains. Ils suggèrent que la

présence d'iGb3 en grande quantité chez la souris empêcherait la formation de ces anticorps (Milland et al., 2006). De plus, si l'iGb3 utilisé dans notre étude a été purifié à partir de tissus de rat par S. Teneberg, l'iGb3 humain n'a jamais été caractérisé. Ces données montrent que si l'iGb3 existe chez l'Homme, il est présent en faible quantité.

Il est également possible que l'antigène présent sur les tumeurs, reconnu par la lectine GS1-B4 corresponde à une expression incompatible de l'antigène de groupe sanguin B, identifié dans plusieurs tumeurs (Ito et al., 1997; Tauchi et al., 1991; Ura et al., 1992).

Pour la suite de notre étude, nous avons utilisé plusieurs types de lignées tumorales humaines dont une seule (HD Mar) exprime naturellement le CD1d. Nous avons identifié un antigène glycolipidique présentant un galactose terminal sur deux lignées humaines : les HeLa et les HEK293. La liaison en $\alpha 1,3$ du galactose a été démontrée sur les cellules HeLa uniquement. Dans le but de confirmer que ce glycolipide est l'iGb3, nous avons souhaité inhiber spécifiquement l'expression de l'iGb3 synthase dans ces cellules par l'utilisation de siRNA, sans succès. En fait, il semblerait que la technique d'interférence à l'ARN ne soit pas adaptée pour l'inhibition cellulaire d'activités enzymatiques. En effet, l'efficacité d'une ARN interférence est en général de 90%, mais on peut penser que les 10% d'enzyme synthétisés présenteront une activité suffisante pour qu'il n'y ait pas de variation d'expression de l'antigène. En parallèle, nous avons mis en évidence la fixation de la lectine GS1-B4 sur les cellules dendritiques sans pouvoir préciser la nature de l'antigène reconnu. Il semble que la fixation de la lectine dépende du donneur et du stade de maturation des cellules. Les cellules dendritiques jouant un rôle clé dans l'immunité, il est probable qu'elles expriment le ligand endogène des NKTi à leur surface.

Une lectine présente une spécificité contre un résidu sucré et une conformation particulière et non contre la molécule complète, la fixation de GS1-B4 ne nous permet donc pas de conclure quant à la nature de l'antigène exprimé à la surface des cellules HeLa, HEK293, cellules dendritiques ou sur les coupes de tissus tumoraux. L'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre l'iGb3 serait nécessaire pour affirmer que c'est sur ce glycolipide que se fixe la lectine GS1-B4. L'équipe de Milland a utilisé un anticorps anti- $\alpha 3$ Gal lors de son étude de l'expression du groupement Gal $\alpha 1,3$ Gal chez des porcs KO pour l' $\alpha 1,3$ -galactosyltransférase (Milland et al., 2006). Cet anticorps reconnaît certainement l'iGb3 et pourrait être utilisé pour confirmer le marquage avec la lectine ainsi

que pour tester l'expression de l'iGb3 sur d'autres lignées tumorales et sur les cellules dendritiques. Une caractérisation biochimique du ligand reconnu sur les cellules dendritiques et tumorales humaines par GS1-B4 serait nécessaire. Cependant, celle-ci pourrait s'avérer difficile car les marquages sont faibles.

Une étape dans la démonstration de la présence d'iGb3 chez l'Homme était de montrer qu'un enzyme fonctionnelle était présente dans les cellules. Nous avons donc voulu cloner le gène codant pour l'iGb3 synthase potentiellement exprimée dans les HeLa, sans succès. En étudiant plus précisément les séquences exoniques de l'ADNc de l'iGb3 synthase sur de l'ADNc issu de testicule, nous avons montré que la forme non épissée et donc non fonctionnelle de l'ADNc était majoritaire. Ce résultat est en accord avec les observations de Taylor et Milland qui mentionnent un épissage incorrect de l'ARN codant l'iGb3 synthase (Milland et al., 2006; Taylor et al., 2003). Cependant, nous avons également mis en évidence une forme épissée minoritaire entre les exons 2 et 4. Même si aucun ADNc complet correctement épissé n'a été amplifié, il est possible qu'il existe mais en quantité infime. Nous pouvons donc nous interroger sur la signification de ces variants d'épissage. En effet, si l'iGb3 synthase n'est pas fonctionnelle, pourquoi conserver une forme épissée alors que l'ARN est majoritairement non épissé. Au contraire, si l'enzyme est fonctionnelle, pourquoi ne mettons nous pas plus d'ADNc épissé en évidence ? Par ailleurs, il semblerait qu'en plus d'un épissage incorrect, un problème dans la région promotrice empêcherait la synthèse de l'iGb3 synthase (Milland et al., 2006).

L'étude de l'expression de l'iGb3 synthase chez l'Homme ne nous permet de conclure définitivement ni sur l'expression du glycolipide à la surface des cellules HeLa, HEK293 et cellules dendritiques, ni sur la présence d'une enzyme fonctionnelle dans ces cellules. On peut cependant affirmer que l'expression de l'iGb3 chez l'Homme, si elle existe, sera faible. L'étude de souris KO hexosaminidase -/- par Zhou et ses collaborateurs montre une implication majeur du ligand endogène des NKTi lors de leur développement (Zhou et al., 2004b). Par la suite, ils montrent que ce ligand endogène est l'iGb3, qui est largement exprimé chez la souris. Le niveau d'expression de l'iGb3 chez l'Homme est tel qu'il semble peu probable qu'il joue un rôle central dans le développement des NKTi.

- Quel ligand pour les cellules NKTi humaines ?

Si l'iGb3 n'est pas le ligand endogène des NKTi humains, on peut s'interroger sur la nature du glycolipide remplissant cette fonction chez l'Homme. En effet, les seuls glycolipides identifiés chez les mammifères présentant un résidu $\alpha 3$ gal terminal sont le xénoantigène et l'iGb3.

Un glycolipide candidat serait le Gb3, identifié en 2000 (Keusch et al., 2000a). Cet antigène est largement exprimé chez l'Homme, suffisamment pour permettre la sélection positive des NKTi. Une hypothèse à envisager serait que le ou les ligands endogènes humains correspondraient à des glycolipides présents en fortes concentrations mais reconnus avec une faible affinité. Dans un tel contexte, le Gb3 pourrait être un candidat, mais d'autres glycolipides présentant un résidu glucidique terminal en anomérie β pourraient également être reconnus comme on l'a vu avec un glycolipide extrait d'algue marine. Il sera donc intéressant de tester la réactivité des clones autoréactifs vis-à-vis de divers glycolipides connus.

Si l'identification de l'antigène endogène des NKTi exprimé par les cellules HEK293, HeLa, Namalwa et HD Mar n'est pas possible par l'utilisation d'anticorps ou de lectines, une stratégie d'étude serait la purification du complexe CD1d-ligand présent à la surface de ces cellules, puis la séparation du glycolipide du complexe et l'analyse de sa structure par RMN. Cependant, cette stratégie nécessite des techniques dont nous ne disposons pas dans notre laboratoire, ce qui les rend plus difficile à réaliser.

- Des sous populations de NKTi aux spécificités différentes

Notre étude a permis de mettre en évidence des sous populations de NKTi aux profils d'activation différents. Alors que les NKTi autoréactifs sont activés par les cellules tumorales en absence d'antigène exogène, les NKTi non autoréactifs reconnaissent leur cible uniquement après chargement avec le KRN7000. Par ailleurs, les NKTi autoréactifs sécrètent de l'IL4, de l'IFN- γ et du TNF- α , présentant donc un profil Th1 et Th2. Au contraire, les NKTi non autoréactifs produisent uniquement des cytokines de type Th1 (IFN- γ et TNF- α). Les clones non autoréactifs utilisés dans cette étude ont été obtenus après stimulation de PBL totaux avec des cellules dendritiques chargées avec PIM₄ (Fischer et al., 2004). Ils présentent

donc une spécificité vis-à-vis d'un antigène bactérien, et synthétisent des cytokines impliquées dans l'immunité anti-bactérienne (de type Th1) ce qui les différencierait des NKTi autoréactifs, obtenus suite à la stimulation de PBL totaux avec des cellules dendritiques chargées avec le KRN7000 à la réponse cytokinique non orientée.

Ces observations nous laissent supposer que lors du développement des NKTi, un antigène endogène reconnu par tous les NKTi permet leur sélection positive, puis des sous populations aux spécificités antigéniques différentes se forment. Cet antigène, impliqué dans le développement des NKTi chez l'Homme n'est pas connu à ce jour.

- Application du modèle murin à l'Homme

L'identification d'un ligand endogène des NKTi murins, l'iGb3, également reconnu par les NKTi humains laissait entendre que ce glycolipide était le ligand endogène des NKTi chez l'Homme. Cependant, si l'iGb3 est largement exprimé chez la souris, ce n'est pas le cas chez l'Homme comme le montrent nos résultats. Par ailleurs, l'expression de la molécule CD1d chez la souris et chez l'Homme est très différente. Si le CD1d est largement exprimé chez l'Homme, son expression chez la souris est restreinte aux lymphocytes, aux cellules présentatrices d'antigène et aux cellules hépatiques. On peut donc supposer que, étant donné le profil d'expression de l'iGb3 chez la souris, l'expression restreinte du CD1d permet de moduler la reconnaissance de l'iGb3 par les NKTi, et d'empêcher ainsi le déclenchement de l'autoimmunité. Au contraire, chez l'Homme, en supposant que l'iGb3 soit un ligand endogène des NKTi, son expression est si faible qu'une large expression de CD1d sur les cellules épithéliales n'entraîne pas leur reconnaissance par les NKTi (figure 51).

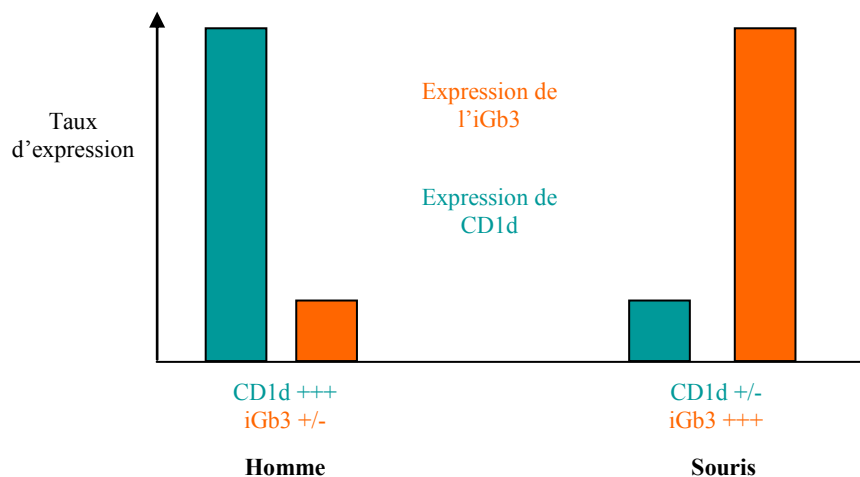


Figure 51 : Représentation schématique de la corrélation entre l'expression de l'iGb3 et du CD1d chez la souris et chez l'Homme

Cette hypothèse d'expression différentielle de CD1d versus le ligand endogène trouve son écho dans les résultats présentés lors de cette thèse avec les lignées tumorales. En effet, les cellules HD Mar expriment naturellement le CD1d. Cependant, ces cellules ne sont reconnues en absence de KRN7000 que par les NKTi B11. Il semble donc qu'elles expriment très faiblement l'antigène endogène. Au contraire, les Namalwa et les HeLa n'expriment pas le CD1d. L'induction de son expression dans ces cellules permet leur reconnaissance par tous les clones NKTi autoréactifs, ce qui laisse supposer qu'elles expriment largement le ligand endogène. Il est donc possible que l'absence d'expression du CD1d ou de l'antigène endogène soit un mécanisme d'échappement des cellules tumorales à la reconnaissance par les NKTi. Cependant, l'expression du ligand endogène par les cellules tumorales, même en absence de CD1d, peut entraîner leur reconnaissance par les cellules NKTi suite à la présentation croisée du ligand par les cellules dendritiques. D'autres systèmes doivent donc être mis en place pour la tumeur afin d'échapper au système immunitaire.

Il semble que la présentation de l'antigène endogène des NKTi chez la souris et l'Homme ne se fasse pas dans les mêmes conditions. Dans ce cas, on peut difficilement extrapoler à l'Homme le mode de sélection positive des NKTi par l'iGb3 chez la souris. Cette observation pose la question de la pertinence de l'application des connaissances sur la physiologie des NKTi murins aux NKTi humains.

Les glycoconjugués sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Mon travail m'a conduit à étudier plus particulièrement la famille GT6 des glycosyltransférases. L'étude phylogénique de la famille GT6 montre une expansion de certains gènes de la famille (comme *Abo* par exemple chez le Xénope) ou au contraire une perte dans certaines espèces (comme *GT6m5*, *GT6m6* chez l'Homme). Nous pouvons donc nous interroger sur l'incidence de l'expression des membres de la famille GT6 dans les différentes espèces.

Les antigènes ABH sont exprimés chez le Xénope. Leur expression chez le poisson n'a pas été démontrée. Il est possible que ces antigènes soient impliqués dans la reconnaissance gamétique au cours de la reproduction. La reproduction du Xénope se fait par fertilisation externe, en milieu aqueux, d'œufs pondus par la femelle. L'expression des antigènes ABH sur l'ovocyte permettrait l'établissement d'une barrière d'espèce au cours de ce phénomène. Chez les mammifères, ce problème ne semble pas se poser, la fécondation étant interne. Pourtant, l'expression des antigènes ABH n'a pas disparu. D'autres fonctions peuvent être suggérées. Notre étude chez le rat montre que non seulement il exprime des glycosyltransférases A et B fonctionnelles, mais en plus qu'il a multiplié le nombre de loci *Abo*. Si les gènes codant les glycosyltransférases A de rat sont polymorphes, ce n'est pas le cas pour celui de la glycosyltransférase B. L'antigène B, mais pas A, de rat est exprimé dans l'oreille interne et le bulbe olfactif au cours de la synaptogénèse. Il est possible qu'il soit impliqué dans l'ouïe et l'olfaction et que ce rôle ne supporte pas de variation allélique (Marionneau et al., 2001). Chez l'Homme, seul un gène *ABO* est conservé et présente un polymorphisme qui permet une expression variable de ABH selon les individus. L'absence de A ou B chez un individu de phénotype O n'affecte pas son développement. Longtemps, ces antigènes ont été considérés comme n'ayant aucun rôle et le maintien de leur expression soulevait nombre d'interrogations. Cependant, l'implication des antigènes ABH dans l'interaction avec des microorganismes pathogènes est aujourd'hui bien documentée. Les antigènes H par exemple sont exprimés de façon massive sur le tractus digestif et permettent la fixation du norovirus de Norwalk responsable de gastroentérites (Marionneau et al., 2002) alors qu'ils ont un rôle protecteur contre les infections avec *E. coli* qui ne se fixe pas sur son ligand substitué par un fucose en position $\alpha 2$ (Ishitoya et al., 2002; Stapleton et al., 1992). Dans ce cas, le polymorphisme ABH permet une protection de la population face à un pathogène qui ne pourra infecter qu'un sous-groupe. Selon les modèles de « trade-off », la transmission du virus entre les individus, diminuée par le polymorphisme, conduira la pathogène à évoluer vers une moindre virulence pour optimiser sa propagation. Il semble

donc que le rôle des antigènes ABH serait la protection de la population en contraignant certains pathogène à évoluer vers une moindre virulence (Le Pendu et al., 2006; Woolhouse et al., 2002).

Le rôle de l'iGb3 dans le développement des NKTi chez la souris est connu (Zhou et al., 2004b). Les NKTi constituent un intermédiaire entre l'immunité innée et acquise. Ils sont activés par l'interaction d'un TCR invariant avec le complexe CD1d-glycolipide. Contrairement à la variabilité mise en jeu lors de la reconnaissance des lymphocytes conventionnels avec les complexes CMH-peptide, les acteurs de l'interaction NKTi avec les cellules cibles sont peu polymorphes. Le TCR ne présente pas de variation jonctionnelle, et le CD1d est largement conservé au cours de l'évolution (Han et al., 1999). Il est possible que le complexe TCR-CD1d présentant peu de variabilité soit apparu avant les complexes TCR-CMH hyper variables et donc que l'apparition des NKTi soit relativement précoce dans l'évolution et marque le début de l'immunité innée. Un gène proche de l'iGb3 (*iGb3-L*) est exprimé chez le poisson. Sa fonctionnalité n'est pas connue et nous ne disposons pas de donnée concernant l'expression des NKTi dans cette espèce. Chez l'Homme, on observe une disparition ou quasi-disparition de l'iGb3 alors que les NKTi restent fonctionnels, suggérant leur adaptation à d'autres ligands.

Les antigènes Forssman et $\alpha 3$ Gal ne sont pas présents chez l'Homme. L'antigène Forssman exprimé à la surface de cellules Vero empêche la fixation de la Shiga toxine (Elliott et al., 2003), il semble donc avoir un rôle protecteur par rapport à certaines infections bactériennes en prévenant le passage de la barrière inter-espèces. Les études de l'évolution de l' $\alpha 1,3$ -galactosyltransférase chez l'Homme et les singes de l'ancien monde par Galili l'ont conduit à supposer qu'un pathogène extrêmement virulent, spécifique du xénoantigène, aurait entraîné sa perte d'expression chez les anthropoïdes (Galili, 2005). Un tel modèle pourrait également expliquer la perte de l'antigène Forssman chez l'Homme.

Les derniers membres identifiés dans la famille GT6 (GT6m5, GT6m6, GT6m7) n'ont pas de fonction enzymatique connue. L'étude des motifs protéiques définis par Heissigerová et ses collaborateurs tend à montrer que GT6m5 et GT6m7 ne fixeraient pas le glycosylnucléotide et seraient donc incapables de transférer un glucide (Heissigerová et al., 2003). Cependant, les séquences protéiques entre espèces sont conservées pour chaque membre. Il est donc possible que ces protéines jouent le rôle de lectine car le site de

reconnaissance de l'accepteur ne semble pas trop altéré. Quant à la protéine GT6m6, si les motifs définis par Heissigerová sont présents en grande majorité, son rôle n'est pas connu à ce jour. Notre étude a été conduite avec la GT6m6 de rat qui présente une mutation au niveau du LBR-A, ce qui pourrait inactiver l'enzyme dans cette espèce uniquement. Il serait intéressant de rechercher l'activité enzymatique GT6m6 à partir d'autres espèces qui ne présentent pas cette altération.

L'expression des antigènes de la famille GT6 est relativement conservée au cours de l'évolution pourtant les situations sont très contrastées d'une espèce à l'autre. Le thème récurrent que l'on observe pour les gènes de cette famille et leurs produits est qu'ils interviennent dans divers phénomènes biologiques impliquant les relations avec l'environnement. Selon les espèces, certains membres de la famille sont amplifiés ou délétés en accord avec les conditions environnementales différentes rencontrées par des espèces distinctes au cours de leur évolution. Les fonctions biologiques de chacun des membres de la famille GT6 doivent donc être étudiées et définies espèce par espèce.

- Adungo, N. I., and Ondijo, S. O. (1987). ABO blood groups in giardiasis in some African ethnic groups in Kenya. *East Afr Med J* 64, 258-262.
- Amprey, J. L., Im, J. S., Turco, S. J., Murray, H. W., Illarionov, P. A., Besra, G. S., Porcelli, S. A., and Spath, G. F. (2004). A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J Exp Med* 200, 895-904.
- Apostolou, I., Takahama, Y., Belmant, C., Kawano, T., Huerre, M., Marchal, G., Cui, J., Taniguchi, M., Nakauchi, H., Fournie, J. J., *et al.* (1999). Murine natural killer T(NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5141-5146.
- Appelmelk, B. J., Negrini, R., Moran, A. P., and Kuipers, E. J. (1997). Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol* 5, 70-73.
- Arase, H., Arase-Fukushi, N., Good, R. A., and Onoe, K. (1993a). Lymphokine-activated killer cell activity of CD4-CD8- TCR alpha beta + thymocytes. *J Immunol* 151, 546-555.
- Arase, H., Arase, N., Nakagawa, K., Good, R. A., and Onoe, K. (1993b). NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur J Immunol* 23, 307-310.
- Ashkar, A. A., and Rosenthal, K. L. (2003). Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* 77, 10168-10171.
- Aspholm-Hurtig, M., Dailide, G., Lahmann, M., Kalia, A., Ilver, D., Roche, N., Vikstrom, S., Sjostrom, R., Linden, S., Backstrom, A., *et al.* (2004). Functional adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science* 305, 519-522.
- Balk, S. P., Burke, S., Polischuk, J. E., Frantz, M. E., Yang, L., Porcelli, S., Colgan, S. P., and Blumberg, R. S. (1994). Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science* 265, 259-262.
- Barnes, G. L., and Kay, R. (1977). Blood-groups in giardiasis. *Lancet* 1, 808.
- Barragan, A., Kremsner, P. G., Wahlgren, M., and Carlson, J. (2000). Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect Immun* 68, 2971-2975.
- Baxter, A. G., Kinder, S. J., Hammond, K. J., Scollay, R., and Godfrey, D. I. (1997). Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46, 572-582.
- Beaudoin, L., Laloux, V., Novak, J., Lucas, B., and Lehuen, A. (2002). NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* 17, 725-736.
- Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296, 553-555.
- Blanken, W. M., and Van den Eijnden, D. H. (1985). Biosynthesis of terminal Gal alpha 1----3Gal beta 1----4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal:N-acetyllactosaminide alpha 1----3-galactosyltransferase from calf thymus. *J Biol Chem* 260, 12927-12934.
- Blasco, E., Torrado, J., Cosme, A., Alvarez, E., Zugasti, A., Gutierrez-Hoyos, A., and Arenas, J. I. (1989). Expression of Lewis antigenic determinants in colorectal adenocarcinomas. *Exp Cell Biol* 57, 153-158.
- Bleicher, P. A., Balk, S. P., Hagen, S. J., Blumberg, R. S., Flotte, T. J., and Terhorst, C. (1990). Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 250, 679-682.
- Bloom, S., Heryet, A., Fleming, K., and Chapman, R. W. (1993). Inappropriate expression of blood group antigens on biliary and colonic epithelia in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 34, 977-983.

- Boix, E., Swaminathan, G. J., Zhang, Y., Natesh, R., Brew, K., and Acharya, K. R. (2001). Structure of UDP complex of UDP-galactose:beta-galactoside-alpha -1,3-galactosyltransferase at 1.53-A resolution reveals a conformational change in the catalytically important C terminus. *J Biol Chem* 276, 48608-48614.
- Bonish, B., Jullien, D., Dutronc, Y., Huang, B. B., Modlin, R., Spada, F. M., Porcelli, S. A., and Nickoloff, B. J. (2000). Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J Immunol* 165, 4076-4085.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G., and Normark, S. (1993). Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262, 1892-1895.
- Bouhours, D., Hansson, G. C., and Bouhours, J. F. (1995). Structure and genetic polymorphism of blood group A-active glycosphingolipids of the rat large intestine. *Biochim Biophys Acta* 1255, 131-140.
- Bradbury, A., Belt, K. T., Neri, T. M., Milstein, C., and Calabi, F. (1988). Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus. *Embo J* 7, 3081-3086.
- Breimer, M. E., Hansson, G. C., Karlsson, K. A., and Leffler, H. (1980). Demonstration of complexity of the glycosphingolipid fraction of rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 95, 416-422.
- Breton, C., Bettler, E., Joziassse, D. H., Geremia, R. A., and Imberty, A. (1998). Sequence-function relationships of prokaryotic and eukaryotic galactosyltransferases. *J Biochem (Tokyo)* 123, 1000-1009.
- Brigl, M., and Brenner, M. B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22, 817-890.
- Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E., and Brenner, M. B. (2003). Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 4, 1230-1237.
- Brossay, L., Jullien, D., Cardell, S., Sydora, B. C., Burdin, N., Modlin, R. L., and Kronenberg, M. (1997). Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol* 159, 1216-1224.
- Brouard, S., Bouhours, D., Seville, F., Menoret, S., Soullillou, J. P., and Vanhove, B. (2000). Induction of anti-Forssman antibodies in the hamster-to-rat xenotransplantation model. *Transplantation* 69, 1193-1201.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Burdin, N., Brossay, L., Degano, M., Iijima, H., Gui, M., Wilson, I. A., and Kronenberg, M. (2000). Structural requirements for antigen presentation by mouse CD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10156-10161.
- Burdin, N., Brossay, L., Koezuka, Y., Smiley, S. T., Grusby, M. J., Gui, M., Taniguchi, M., Hayakawa, K., and Kronenberg, M. (1998). Selective ability of mouse CD1 to present glycolipids: alpha-galactosylceramide specifically stimulates V alpha 14+ NK T lymphocytes. *J Immunol* 161, 3271-3281.
- Burdin, N., Brossay, L., and Kronenberg, M. (1999). Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur J Immunol* 29, 2014-2025.
- Cailleau-Thomas, A., Le Moullac-Vaidye, B., Rocher, J., Bouhours, D., Szpirer, C., and Le Pendu, J. (2002). Cloning of a rat gene encoding the histo-blood group A enzyme. Tissue expression of the gene and of the A and B antigens. *Eur J Biochem* 269, 4040-4047.
- Calabi, F., Jarvis, J. M., Martin, L., and Milstein, C. (1989). Two classes of CD1 genes. *Eur J Immunol* 19, 285-292.
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 326 (Pt 3), 929-939.

- Canchis, P. W., Bhan, A. K., Landau, S. B., Yang, L., Balk, S. P., and Blumberg, R. S. (1993). Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology* 80, 561-565.
- Carlson, J., Helmby, H., Hill, A. V., Brewster, D., Greenwood, B. M., and Wahlgren, M. (1990). Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet* 336, 1457-1460.
- Chang, D. H., Osman, K., Connolly, J., Kukreja, A., Krasovsky, J., Pack, M., Hutchinson, A., Geller, M., Liu, N., Annable, R., *et al.* (2005). Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med* 201, 1503-1517.
- Chihara, Y., Sugano, K., Kobayashi, A., Kanai, Y., Yamamoto, H., Nakazono, M., Fujimoto, H., Kakizoe, T., Fujimoto, K., Hirohashi, S., and Hirao, Y. (2005). Loss of blood group A antigen expression in bladder cancer caused by allelic loss and/or methylation of the ABO gene. *Lab Invest* 85, 895-907.
- Cho, S., Knox, K. S., Kohli, L. M., He, J. J., Exley, M. A., Wilson, S. B., and Brutkiewicz, R. R. (2005). Impaired cell surface expression of human CD1d by the formation of an HIV-1 Nef/CD1d complex. *Virology* 337, 242-252.
- Chun, T., Page, M. J., Gapin, L., Matsuda, J. L., Xu, H., Nguyen, H., Kang, H. S., Stanic, A. K., Joyce, S., Koltun, W. A., *et al.* (2003). CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells. *J Exp Med* 197, 907-918.
- Clausen, H., and Hakomori, S. (1989). ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 56, 1-20.
- Clausen, H., Hakomori, S., Graem, N., and Dabelsteen, E. (1986). Incompatible A antigen expressed in tumors of blood group O individuals: immunochemical, immunohistologic, and enzymatic characterization. *J Immunol* 136, 326-330.
- Cohen, B. H., Ball, W. C., Jr., Brashears, S., Diamond, E. L., Kreiss, P., Levy, D. A., Menkes, H. A., Permutt, S., and Tockman, M. S. (1977). Risk factors in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Epidemiol* 105, 223-232.
- Coles, M. C., and Raulet, D. H. (2000). NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells. *J Immunol* 164, 2412-2418.
- Coon, J. S., McCall, A., Miller, A. W., 3rd, Farrow, G. M., and Weinstein, R. S. (1985). Expression of blood-group-related antigens in carcinoma in situ of the urinary bladder. *Cancer* 56, 797-804.
- Cordon-Cardo, C., Lloyd, K. O., Sakamoto, J., McGroarty, M. E., Old, L. J., and Melamed, M. R. (1986). Immunohistologic expression of blood-group antigens in normal human gastrointestinal tract and colonic carcinoma. *Int J Cancer* 37, 667-676.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., and Henrissat, B. (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* 328, 307-317.
- Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623-1626.
- D'Andrea, A., Goux, D., De Lalla, C., Koezuka, Y., Montagna, D., Moretta, A., Dellabona, P., Casorati, G., and Abrignani, S. (2000). Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur J Immunol* 30, 1544-1550.
- Dabelsteen, E., Clausen, H., Holmstrup, P., and Reibel, J. (1988a). Premalignant and malignant oral lesions are associated with changes in the glycosylation pattern of carbohydrates related to ABH blood group antigens. *Apmis* 96, 813-819.

- Dabelsteen, E., Graem, N., Clausen, H., and Hakomori, S. (1988b). Structural variations of blood group A antigens in human normal colon and carcinomas. *Cancer Res* 48, 181-187.
- Dao, T., Guo, D., Ploss, A., Stolzer, A., Saylor, C., Boursalian, T. E., Im, J. S., and Sant'Angelo, D. B. (2004). Development of CD1d-restricted NKT cells in the mouse thymus. *Eur J Immunol* 34, 3542-3552.
- David, L., Leitao, D., Sobrinho-Simoes, M., Bennett, E. P., White, T., Mandel, U., Dabelsteen, E., and Clausen, H. (1993). Biosynthetic basis of incompatible histo-blood group A antigen expression: anti-A transferase antibodies reactive with gastric cancer tissue of type O individuals. *Cancer Res* 53, 5494-5500.
- De Libero, G., and Mori, L. (2005). Recognition of lipid antigens by T cells. *Nat Rev Immunol* 5, 485-496.
- Defize, L. H., Arndt-Jovin, D. J., Jovin, T. M., Boonstra, J., Meisenhelder, J., Hunter, T., de Hey, H. T., and de Laat, S. W. (1988). A431 cell variants lacking the blood group A antigen display increased high affinity epidermal growth factor-receptor number, protein-tyrosine kinase activity, and receptor turnover. *J Cell Biol* 107, 939-949.
- Elliott, S. P., Yu, M., Xu, H., and Haslam, D. B. (2003). Forssman synthetase expression results in diminished shiga toxin susceptibility: a role for glycolipids in determining host-microbe interactions. *Infect Immun* 71, 6543-6552.
- Ernst, C., Thurin, J., Atkinson, B., Wurzel, H., Herlyn, M., Stromberg, N., Civin, C., and Koprowski, H. (1984). Monoclonal antibody localization of A and B isoantigens in normal and malignant fixed human tissues. *Am J Pathol* 117, 451-461.
- Espevik, T., and Nissen-Meyer, J. (1986). A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J Immunol Methods* 95, 99-105.
- Eto, T., Ichikawa, Y., Nishimura, K., Ando, S., and Yamakawa, T. (1968). Chemistry of lipid of the postthymolytic residue or stroma of erythrocytes. XVI. Occurrence of ceramide pentasaccharide in the membrane of erythrocytes and reticulocytes of rabbit. *J Biochem (Tokyo)* 64, 205-213.
- Exley, M., Garcia, J., Wilson, S. B., Spada, F., Gerdes, D., Tahir, S. M., Patton, K. T., Blumberg, R. S., Porcelli, S., Chott, A., and Balk, S. P. (2000). CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. *Immunology* 100, 37-47.
- Falk, P., Holgersson, J., Jovall, P. A., Karlsson, K. A., Stromberg, N., Thurin, J., Brodin, T., and Sjogren, H. O. (1986). An antigen present in rat adenocarcinoma and normal colon non-epithelial stroma is a novel Forssman-like glycolipid based on isoglobotetraosylceramide. *Biochim Biophys Acta* 878, 296-299.
- Faveeuw, C., Angeli, V., Fontaine, J., Maliszewski, C., Capron, A., Van Kaer, L., Moser, M., Capron, M., and Trottein, F. (2002). Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to *Schistosoma mansoni* glycoconjugates in mice. *J Immunol* 169, 906-912.
- Fischer, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Koebernick, H., Zerrahn, J., Maillet, S., Hurwitz, R., Kursar, M., Bonneville, M., Kaufmann, S. H., and Schaible, U. E. (2004). Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10685-10690.
- Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M., and Steinman, R. M. (2002). Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* 3, 867-874.
- Fujii, S., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L., and Steinman, R. M. (2003). Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med* 198, 267-279.
- Galili, U. (2005). The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 83, 674-686.

- Galili, U., Shohet, S. B., Kobrin, E., Stults, C. L., and Macher, B. A. (1988). Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 263, 17755-17762.
- Gansert, J. L., Kiessler, V., Engele, M., Wittke, F., Rollinghoff, M., Krensky, A. M., Porcelli, S. A., Modlin, R. L., and Stenger, S. (2003). Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol* 170, 3154-3161.
- Gansuud, B., Hagihara, M., Yu, Y., Inoue, H., Ueda, Y., Tsuchiya, T., Masui, A., Ando, K., Nakamura, Y., Munkhtuvshin, N., *et al.* (2002). Human umbilical cord blood NK T cells kill tumors by multiple cytotoxic mechanisms. *Hum Immunol* 63, 164-175.
- Gapin, L., Matsuda, J. L., Surh, C. D., and Kronenberg, M. (2001). NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2, 971-978.
- Gastinel, L. N., Bignon, C., Misra, A. K., Hindsgaul, O., Shaper, J. H., and Joziase, D. H. (2001). Bovine alpha1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases. *Embo J* 20, 638-649.
- George, V. T., Elston, R. C., Amos, C. I., Ward, L. J., and Berenson, G. S. (1987). Association between polymorphic blood markers and risk factors for cardiovascular disease in a large pedigree. *Genet Epidemiol* 4, 267-275.
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehke, S., Classen, M., and Prinz, C. (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12778-12783.
- Gerlini, G., Hefti, H. P., Kleinhans, M., Nickoloff, B. J., Burg, G., and Nestle, F. O. (2001). Cd1d is expressed on dermal dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol* 117, 576-582.
- Giaccone, G., Punt, C. J., Ando, Y., Ruijter, R., Nishi, N., Peters, M., von Blomberg, B. M., Scheper, R. J., van der Vliet, H. J., van den Eertwegh, A. J., *et al.* (2002). A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 8, 3702-3709.
- Gil-Loyzaga, P., Pujol, R., Mollicone, R., Dalix, A. M., and Oriol, R. (1989). Appearance of B and H blood group antigens in the developing cochlear hair cells. *Cell Tissue Res* 257, 17-21.
- Gillessen, S., Naumov, Y. N., Nieuwenhuis, E. E., Exley, M. A., Lee, F. S., Mach, N., Luster, A. D., Blumberg, R. S., Taniguchi, M., Balk, S. P., *et al.* (2003). CD1d-restricted T cells regulate dendritic cell function and antitumor immunity in a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8874-8879.
- Gillum, R. F. (1991). Blood groups, serum cholesterol, serum uric acid, blood pressure, and obesity in adolescents. *J Natl Med Assoc* 83, 682-688.
- Glinksy, G. V. (1992). The blood group antigen-related glycoepitopes: key structural determinants in immunogenesis and AIDS pathogenesis. *Med Hypotheses* 39, 212-224.
- Godfrey, D. I., Kinder, S. J., Silvera, P., and Baxter, A. G. (1997). Flow cytometric study of T cell development in NOD mice reveals a deficiency in alpha-betaTCR+CD8- thymocytes. *J Autoimmun* 10, 279-285.
- Gombert, J. M., Herbelin, A., Tancrede-Bohin, E., Dy, M., Carnaud, C., and Bach, J. F. (1996). Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 26, 2989-2998.
- Gonzalez-Campora, R., Garcia-Sanatana, J. A., Jorda i Heras, M. M., Salaverri, C. O., Vazquez-Ramirez, F. J., Argueta-Manzano, O. E., and Galera-Davidson, H. (1998). Blood group antigens in differentiated thyroid neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 122, 957-965.

- Griffin, N. R., and Wells, M. (1993). Semiquantitative immunohistochemical studies of blood group antigen A, B, H, Le(a), Le(b) structures and Ii backbone chains in the normal human cervix and in cervical adenocarcinoma. *Histochem J* 25, 228-241.
- Grubor-Bauk, B., Simmons, A., Mayrhofer, G., and Speck, P. G. (2003). Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol* 170, 1430-1434.
- Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T., and Brenner, M. B. (2002). Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195, 625-636.
- Gumperz, J. E., Roy, C., Makowska, A., Lum, D., Sugita, M., Podrebarac, T., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Cardell, S., Brenner, M. B., and Behar, S. M. (2000). Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 12, 211-221.
- Gustavsson, M. L., Gannedahl, G., Backer, A. E., Larson, G., Olling, A., Tufveson, G., and Samuelsson, B. E. (1996). Anti-carbohydrate antibodies associated with hyperacute rejection in a vascularized mouse heart-to-rat xenotransplantation model. *Transplantation* 61, 957-963.
- Gustavsson, M. L., Johnsson, C., Albertsson, P., Lukes, D., Steen, L. M., Johansson, B. R., Mjornstedt, L., Norrby, J., Tufveson, G., and Olausson, M. (2001). Characterization of Forssman and other antigen/antibody systems in vascularized mouse heart to rat xenotransplantation. *Scand J Immunol* 53, 121-131.
- Hage, C. A., Kohli, L. L., Cho, S., Brutkiewicz, R. R., Twigg, H. L., 3rd, and Knox, K. S. (2005). Human immunodeficiency virus gp120 downregulates CD1d cell surface expression. *Immunol Lett* 98, 131-135.
- Hakomori, S. I., Koscielak, J., Bloch, K. J., and Jeanloz, R. W. (1967). Immunologic relationship between blood group substances and a fucose-containing glycolipid of human adenocarcinoma. *J Immunol* 98, 31-38.
- Hameg, A., Gouarin, C., Gombert, J. M., Hong, S., Van Kaer, L., Bach, J. F., and Herbelin, A. (1999). IL-7 up-regulates IL-4 production by splenic NK1.1+ and NK1.1- MHC class I-like/CD1-dependent CD4+ T cells. *J Immunol* 162, 7067-7074.
- Hammond, K. J., Poulton, L. D., Palmisano, L. J., Silveira, P. A., Godfrey, D. I., and Baxter, A. G. (1998). alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 187, 1047-1056.
- Han, M., Hannick, L. I., DiBrino, M., and Robinson, M. A. (1999). Polymorphism of human CD1 genes. *Tissue Antigens* 54, 122-127.
- Hansen, D. S., Siomos, M. A., Buckingham, L., Scalzo, A. A., and Schofield, L. (2003). Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* 18, 391-402.
- Hansen, J. E., Clausen, H., Nielsen, C., Teglbjaerg, L. S., Hansen, L. L., Nielsen, C. M., Dabelsteen, E., Mathiesen, L., Hakomori, S. I., and Nielsen, J. O. (1990). Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) infection in vitro by anticarbohydrate monoclonal antibodies: peripheral glycosylation of HIV envelope glycoprotein gp120 may be a target for virus neutralization. *J Virol* 64, 2833-2840.
- Hansson, G. C., Bouhours, J. F., and Angstrom, J. (1987). Characterization of neutral blood group B-active glycosphingolipids of rat gastric mucosa. A novel type of blood group active glycosphingolipid based on isogloboside. *J Biol Chem* 262, 13135-13141.
- Hashimoto, W., Takeda, K., Anzai, R., Ogasawara, K., Sakihara, H., Sugiura, K., Seki, S., and Kumagai, K. (1995). Cytotoxic NK1.1 Ag+ alpha beta T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. *J Immunol* 154, 4333-4340.
- Haslam, D. B., and Baenziger, J. U. (1996). Expression cloning of Forssman glycolipid synthetase: a novel member of the histo-blood group ABO gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10697-10702.

- Hattori, H., Uemura, K., Ogata, H., Katsuyama, T., Taketomi, T., and Kanfer, J. N. (1987). Characterization of glycolipids from the gastric cancer of a patient of p,O,Le(a-,b+) blood type: presence of incompatible blood group antigens in tumor tissues. *Cancer Res* 47, 1968-1972.
- Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Kakuta, S., Iwakura, Y., Van Kaer, L., Saiki, I., and Okumura, K. (2001). Critical contribution of IFN-gamma and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* 31, 1720-1727.
- Heissigerova, H., Breton, C., Moravcova, J., and Imberty, A. (2003). Molecular modeling of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of blood group A, blood group B, Forssman, and iGb3 antigens and their interaction with substrates. *Glycobiology* 13, 377-386.
- Heneghan, M. A., McCarthy, C. F., and Moran, A. P. (2000). Relationship of blood group determinants on *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide with host lewis phenotype and inflammatory response. *Infect Immun* 68, 937-941.
- Henion, T. R., Macher, B. A., Anaraki, F., and Galili, U. (1994). Defining the minimal size of catalytically active primate alpha 1,3 galactosyltransferase: structure-function studies on the recombinant truncated enzyme. *Glycobiology* 4, 193-201.
- Hirabayashi, J., Arata, Y., and Kasai, K. (2001). Glycome project: concept, strategy and preliminary application to *Caenorhabditis elegans*. *Proteomics* 1, 295-303.
- Hirohashi, S., Shimosato, Y., Ino, Y., Tome, Y., Watanabe, M., Hirota, T., and Itabashi, M. (1984). Distribution of blood group antigens and CA 19-9 in gastric cancers and non-neoplastic gastric mucosa. *Gann* 75, 540-547.
- Hoskins, L. C., and Boulding, E. T. (1976a). Degradation of blood group antigens in human colon ecosystems. I. In vitro production of ABH blood group-degrading enzymes by enteric bacteria. *J Clin Invest* 57, 63-73.
- Hoskins, L. C., and Boulding, E. T. (1976b). Degradation of blood group antigens in human colon ecosystems. II. A gene interaction in man that affects the fecal population density of certain enteric bacteria. *J Clin Invest* 57, 74-82.
- Hounsell, E. F., Davies, M. J., and Renouf, D. V. (1996). O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj J* 13, 19-26.
- Ishihara, S., Nieda, M., Kitayama, J., Osada, T., Yabe, T., Kikuchi, A., Koezuka, Y., Porcelli, S. A., Tadokoro, K., Nagawa, H., and Juji, T. (2000). Alpha-glycosylceramides enhance the antitumor cytotoxicity of hepatic lymphocytes obtained from cancer patients by activating CD3-CD56+ NK cells in vitro. *J Immunol* 165, 1659-1664.
- Ishikawa, A., Motohashi, S., Ishikawa, E., Fuchida, H., Higashino, K., Otsuji, M., Iizasa, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Fujisawa, T. (2005). A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 1910-1917.
- Ishitoya, S., Yamamoto, S., Mitumori, K., Ogawa, O., and Terai, A. (2002). Non-secreter status is associated with female acute uncomplicated pyelonephritis. *BJU Int* 89, 851-854.
- Ito, N., Nagaike, C., Morimura, Y., and Hatake, H. (1997). Estimation and comparison of the contents of blood group B antigens in selected human tissues by microphotometric quantification of Griffonia simplicifolia agglutinin I-B4 staining with or without prior alpha-galactosidase digestion. *Histol Histopathol* 12, 415-424.
- Itzkowitz, S. (1992). Carbohydrate changes in colon carcinoma. *APMIS Suppl* 27, 173-180.
- Itzkowitz, S. H., Yuan, M., Ferrell, L. D., Palekar, A., and Kim, Y. S. (1986). Cancer-associated alterations of blood group antigen expression in human colorectal polyps. *Cancer Res* 46, 5976-5984.

- Itzkowitz, S. H., Yuan, M., Ferrell, L. D., Ratcliffe, R. M., Chung, Y. S., Satake, K., Umeyama, K., Jones, R. T., and Kim, Y. S. (1987). Cancer-associated alterations of blood group antigen expression in the human pancreas. *J Natl Cancer Inst* 79, 425-434.
- Iwamoto, S., Withers, D. A., Handa, K., and Hakomori, S. (1999). Deletion of A-antigen in a human cancer cell line is associated with reduced promoter activity of CBF/NF-Y binding region, and possibly with enhanced DNA methylation of A transferase promoter. *Glycoconj J* 16, 659-666.
- Jayawardena-Wolf, J., Benlagha, K., Chiu, Y. H., Mehr, R., and Bendelac, A. (2001). CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity* 15, 897-908.
- Johnson, T. R., Hong, S., Van Kaer, L., Koezuka, Y., and Graham, B. S. (2002). NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *J Virol* 76, 4294-4303.
- Joyce, S., Woods, A. S., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., De Silva, A. D., Boesteanu, A., Balk, S. P., Cotter, R. J., and Brutkiewicz, R. R. (1998). Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science* 279, 1541-1544.
- Joziasse, D. H., Shaper, J. H., Van den Eijnden, D. H., Van Tunen, A. J., and Shaper, N. L. (1989). Bovine alpha 1----3-galactosyltransferase: isolation and characterization of a cDNA clone. Identification of homologous sequences in human genomic DNA. *J Biol Chem* 264, 14290-14297.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., and Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15, 153-164.
- Kang, S. J., and Cresswell, P. (2002). Calnexin, calreticulin, and ERp57 cooperate in disulfide bond formation in human CD1d heavy chain. *J Biol Chem* 277, 44838-44844.
- Kang, S. J., and Cresswell, P. (2004). Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat Immunol* 5, 175-181.
- Kashiwase, K., Kikuchi, A., Ando, Y., Nicol, A., Porcelli, S. A., Tokunaga, K., Omine, M., Satake, M., Juji, T., Nieda, M., and Koezuka, Y. (2003). The CD1d natural killer T-cell antigen presentation pathway is highly conserved between humans and rhesus macaques. *Immunogenetics* 54, 776-781.
- Kauffmann, F., Frette, C., Pham, Q. T., Nafissi, S., Bertrand, J. P., and Oriol, R. (1996). Associations of blood group-related antigens to FEV1, wheezing, and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 76-82.
- Kawai, T., Suzuki, M., Kase, K., and Ozeki, Y. (1993). Expression of carbohydrate antigens in human pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 72, 1581-1587.
- Kawamura, T., Takeda, K., Mendiratta, S. K., Kawamura, H., Van Kaer, L., Yagita, H., Abo, T., and Okumura, K. (1998). Critical role of NK1+ T cells in IL-12-induced immune responses in vivo. *J Immunol* 160, 16-19.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., *et al.* (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626-1629.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., *et al.* (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5690-5693.
- Keusch, J. J., Manzella, S. M., Nyame, K. A., Cummings, R. D., and Baenziger, J. U. (2000a). Cloning of Gb3 synthase, the key enzyme in globo-series glycosphingolipid synthesis, predicts a family of alpha 1, 4-glycosyltransferases conserved in plants, insects, and mammals. *J Biol Chem* 275, 25315-25321.

- Keusch, J. J., Manzella, S. M., Nyame, K. A., Cummings, R. D., and Baenziger, J. U. (2000b). Expression cloning of a new member of the ABO blood group glycosyltransferases, iGb3 synthase, that directs the synthesis of isoglobo-glycosphingolipids. *J Biol Chem* 275, 25308-25314.
- Kim, C. H., Johnston, B., and Butcher, E. C. (2002). Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100, 11-16.
- Kinjo, Y., Wu, D., Kim, G., Xing, G. W., Poles, M. A., Ho, D. D., Tsuji, M., Kawahara, K., Wong, C. H., and Kronenberg, M. (2005). Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434, 520-525.
- Kirkeby, S., and Moe, D. (2001). Binding of Griffonia simplicifolia I isolectin B4 (GS1 B4) to alpha-galactose antigens. *Immunol Cell Biol* 79, 121-127.
- Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Nishimura, S., Ohta, A., Ohmi, Y., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., *et al.* (1999). The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 189, 1121-1128.
- Kobayashi, E., Motoki, K., Uchida, T., Fukushima, H., and Koezuka, Y. (1995). KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* 7, 529-534.
- Koch, M., Stronge, V. S., Shepherd, D., Gadola, S. D., Mathew, B., Ritter, G., Fersht, A. R., Besra, G. S., Schmidt, R. R., Jones, E. Y., and Cerundolo, V. (2005). The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. *Nat Immunol* 6, 819-826.
- Kominato, Y., Hata, Y., Takizawa, H., Tsuchiya, T., Tsukada, J., and Yamamoto, F. (1999). Expression of human histo-blood group ABO genes is dependent upon DNA methylation of the promoter region. *J Biol Chem* 274, 37240-37250.
- Kominato, Y., McNeill, P. D., Yamamoto, M., Russell, M., Hakomori, S., and Yamamoto, F. (1992). Animal histo-blood group ABO genes. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 154-164.
- Krupnick, J. G., Damjanov, I., Damjanov, A., Zhu, Z. M., and Fenderson, B. A. (1994). Globo-series carbohydrate antigens are expressed in different forms on human and murine teratocarcinoma-derived cells. *Int J Cancer* 59, 692-698.
- Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., Ten, S., Sanz, M., Exley, M., Wilson, B., *et al.* (2002). Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 109, 131-140.
- Lantz, O., and Bendelac, A. (1994). An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4- T cells in mice and humans. *J Exp Med* 180, 1097-1106.
- Lawton, A. P., Prigozy, T. I., Brossay, L., Pei, B., Khurana, A., Martin, D., Zhu, T., Spate, K., Ozga, M., Honing, S., *et al.* (2005). The mouse CD1d cytoplasmic tail mediates CD1d trafficking and antigen presentation by adaptor protein 3-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 174, 3179-3186.
- Le Pendu, J., Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., and Clement, M. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *Apmis* 109, 9-31.
- Le Pendu, J., Ruvoën-Clouet, N., Kindberg, E., and Svensson, L. (2006). Mendelian resistance to human norovirus infections. *Sem immunology in press*.
- Lee, D. J., Abeyratne, A., Carson, D. A., and Corr, M. (1998). Induction of an antigen-specific, CD1-restricted cytotoxic T lymphocyte response *In vivo*. *J Exp Med* 187, 433-438.

- Lee, J. S., Ro, J. Y., Sahin, A. A., Hong, W. K., Brown, B. W., Mountain, C. F., and Hittelman, W. N. (1991). Expression of blood-group antigen A--a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 324, 1084-1090.
- Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 195, 637-641.
- Leite-De-Moraes, M. C., Hameg, A., Pacilio, M., Koezuka, Y., Taniguchi, M., Van Kaer, L., Schneider, E., Dy, M., and Herbelin, A. (2001). IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J Immunol* 166, 945-951.
- Mandal, M., Chen, X. R., Alegre, M. L., Chiu, N. M., Chen, Y. H., Castano, A. R., and Wang, C. R. (1998). Tissue distribution, regulation and intracellular localization of murine CD1 molecules. *Mol Immunol* 35, 525-536.
- Mandel, U., Langkilde, N. C., Orntoft, T. F., Therkildsen, M. H., Karkov, J., Reibel, J., White, T., Clausen, H., and Dabelsteen, E. (1992). Expression of histo-blood-group-A/B-gene-defined glycosyltransferases in normal and malignant epithelia: correlation with A/B-carbohydrate expression. *Int J Cancer* 52, 7-12.
- Marionneau, S., Cailleau-Thomas, A., Rocher, J., Le Moullac-Vaidye, B., Ruvoen, N., Clement, M., and Le Pendu, J. (2001). ABH and Lewis histo-blood group antigens, a model for the meaning of oligosaccharide diversity in the face of a changing world. *Biochimie* 83, 565-573.
- Marionneau, S., Ruvoen, N., Le Moullac-Vaidye, B., Clement, M., Cailleau-Thomas, A., Ruiz-Palacois, G., Huang, P., Jiang, X., and Le Pendu, J. (2002). Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 122, 1967-1977.
- Mars, L. T., Laloux, V., Goude, K., Desbois, S., Saoudi, A., Van Kaer, L., Lassmann, H., Herbelin, A., Lehuen, A., and Liblau, R. S. (2002). Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 168, 6007-6011.
- Matsuda, J. L., Gapin, L., Baron, J. L., Sidobre, S., Stetson, D. B., Mohrs, M., Locksley, R. M., and Kronenberg, M. (2003). Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8395-8400.
- Matsuda, J. L., Gapin, L., Fazilleau, N., Warren, K., Naidenko, O. V., and Kronenberg, M. (2001). Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12636-12641.
- Matsuda, J. L., Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C. R., Koezuka, Y., and Kronenberg, M. (2000). Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 192, 741-754.
- Matsumoto, H., Muramatsu, H., Shimotakahara, T., Yanagi, M., Nishijima, H., Mitani, N., Baba, K., Muramatsu, T., and Shimazu, H. (1993). Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinomas. *Cancer* 72, 75-81.
- Mattner, J., Debord, K. L., Ismail, N., Goff, R. D., Cantu, C., 3rd, Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., *et al.* (2005). Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434, 525-529.
- Meldgaard, P., Holmes, E. H., Bennett, E. P., Clausen, H., Zeuthen, J., Wolf, H., and Orntoft, T. F. (1994). Blood group ABO-related glycosylation of urothelial cell lines: immunocytological, enzymatic, and genetic characterization. *Cancer Res* 54, 2440-2447.
- Memon, R. S., Yonezawa, S., Hasui, K., and Sato, E. (1990). Expression of blood group antigens and lectin binding in adenocarcinomas of the endometrium. *Acta Pathol Jpn* 40, 509-516.

- Mempel, M., Ronet, C., Suarez, F., Gilleron, M., Puzo, G., Van Kaer, L., Lehuen, A., Kourilsky, P., and Gachelin, G. (2002). Natural killer T cells restricted by the monomorphic MHC class 1b CD1d1 molecules behave like inflammatory cells. *J Immunol* 168, 365-371.
- Mengwasser, J., and Sleeman, J. P. (2001). Expression of M-N#1, a histo-blood group B-like antigen, is strongly up-regulated in nonapoptosing mammary epithelial cells during rat mammary gland involution. *Glycobiology* 11, 441-449.
- Metelitsa, L. S., Naidenko, O. V., Kant, A., Wu, H. W., Loza, M. J., Perussia, B., Kronenberg, M., and Seeger, R. C. (2001). Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol* 167, 3114-3122.
- Metoki, R., Kakudo, K., Tsuji, Y., Teng, N., Clausen, H., and Hakomori, S. (1989). Deletion of histo-blood group A and B antigens and expression of incompatible A antigen in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 81, 1151-1157.
- Milland, J., Christiansen, D., Lazarus, B. D., Taylor, S. G., Xing, P. X., and Sandrin, M. S. (2006). The molecular basis for galalpha(1,3)gal expression in animals with a deletion of the alpha1,3galactosyltransferase gene. *J Immunol* 176, 2448-2454.
- Milland, J., Christiansen, D., and Sandrin, M. S. (2005). Alpha1,3-galactosyltransferase knockout pigs are available for xenotransplantation: are glycosyltransferases still relevant? *Immunol Cell Biol* 83, 687-693.
- Moeller, A., Weippert-Kretschmer, M., Prinz, H., and Kretschmer, V. (2001). Influence of ABO blood groups on primary hemostasis. *Transfusion* 41, 56-60.
- Motsinger, A., Haas, D. W., Stanic, A. K., Van Kaer, L., Joyce, S., and Unutmaz, D. (2002). CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* 195, 869-879.
- Mouricout, M. (1997). Interactions between the enteric pathogen and the host. An assortment of bacterial lectins and a set of glycoconjugate receptors. *Adv Exp Med Biol* 412, 109-123.
- Nakagawa, R., Nagafune, I., Tazunoki, Y., Ehara, H., Tomura, H., Iijima, R., Motoki, K., Kamishohara, M., and Seki, S. (2001). Mechanisms of the antimetastatic effect in the liver and of the hepatocyte injury induced by alpha-galactosylceramide in mice. *J Immunol* 166, 6578-6584.
- Nakagoe, T., Fukushima, K., Hirota, M., Kusano, H., Kawahara, K., Ayabe, H., Tomita, M., and Kamihira, S. (1991). Immunohistochemical expression of blood group substances and related carbohydrate antigens in breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 82, 559-568.
- Nakagoe, T., Fukushima, K., Tuji, T., Sawai, T., Nanashima, A., Yamaguchi, H., Yasutake, T., Hara, S., Ayabe, H., Matuo, T., and Kamihira, S. (1998). Immunohistochemical expression of ABH/Lewis-related antigens in primary breast carcinomas and metastatic lymph node lesions. *Cancer Detect Prev* 22, 499-505.
- Naumov, Y. N., Bahjat, K. S., Gausling, R., Abraham, R., Exley, M. A., Koezuka, Y., Balk, S. B., Strominger, J. L., Clare-Salzer, M., and Wilson, S. B. (2001). Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13838-13843.
- Ndamba, J., Gomo, E., Nyazema, N., Makaza, N., and Kaondera, K. C. (1997). Schistosomiasis infection in relation to the ABO blood groups among school children in Zimbabwe. *Acta Trop* 65, 181-190.
- Nei, M., and Rooney, A. P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39, 121-152.
- Nicol, A., Nieda, M., Koezuka, Y., Porcelli, S., Suzuki, K., Tadokoro, K., Durrant, S., and Juji, T. (2000). Human invariant valpha24+ natural killer T cells activated by alpha-galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. *Immunology* 99, 229-234.

- Nieda, M., Nicol, A., Koezuka, Y., Kikuchi, A., Lapteva, N., Tanaka, Y., Tokunaga, K., Suzuki, K., Kayagaki, N., Yagita, H., *et al.* (2001). TRAIL expression by activated human CD4(+)V alpha 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 97, 2067-2074.
- Nieuwenhuis, E. E., Matsumoto, T., Exley, M., Schleipman, R. A., Glickman, J., Bailey, D. T., Corazza, N., Colgan, S. P., Onderdonk, A. B., and Blumberg, R. S. (2002). CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat Med* 8, 588-593.
- Nishihara, S., Hiraga, T., Ikehara, Y., Kudo, T., Iwasaki, H., Morozumi, K., Akamatsu, S., Tachikawa, T., and Narimatsu, H. (1999). Molecular mechanisms of expression of Lewis b antigen and other type I Lewis antigens in human colorectal cancer. *Glycobiology* 9, 607-616.
- O'Donnell, J., Boulton, F. E., Manning, R. A., and Laffan, M. A. (2002). Amount of H antigen expressed on circulating von Willebrand factor is modified by ABO blood group genotype and is a major determinant of plasma von Willebrand factor antigen levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 335-341.
- Oberhuber, G., Kranz, A., Dejaco, C., Dragosics, B., Mosberger, I., Mayr, W., and Radaszkiewicz, T. (1997). Blood groups Lewis(b) and ABH expression in gastric mucosa: lack of inter-relation with *Helicobacter pylori* colonisation and occurrence of gastric MALT lymphoma. *Gut* 41, 37-42.
- Oikawa, Y., Shimada, A., Yamada, S., Motohashi, Y., Nakagawa, Y., Irie, J., Maruyama, T., and Saruta, T. (2002). High frequency of valpha24(+) vbeta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25, 1818-1823.
- Okada, Y., Arima, T., Togawa, K., Nagashima, H., Jinno, K., Moriwaki, S., Kunitomo, T., Thurin, J., and Koprowski, H. (1987). Neoexpression of ABH and Lewis blood group antigens in human hepatocellular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 78, 19-28.
- Ono, K., Hattori, H., Uemura, K., Nakayama, J., Ota, H., and Katsuyama, T. (1994). Expression of Forssman antigen in human large intestine. *J Histochem Cytochem* 42, 659-665.
- Oriol, R., Martinez-Duncker, I., Chantret, I., Mollicone, R., and Codogno, P. (2002). Common origin and evolution of glycosyltransferases using Dol-P-monosaccharides as donor substrate. *Mol Biol Evol* 19, 1451-1463.
- Oriol, R., Mollicone, R., Coullin, P., Dalix, A. M., and Candelier, J. J. (1992). Genetic regulation of the expression of ABH and Lewis antigens in tissues. *APMIS Suppl* 27, 28-38.
- Orlow, I., Lacombe, L., Pellicer, I., Rabbani, F., Delgado, R., Zhang, Z. F., Szijan, I., and Cordon-Cardo, C. (1998). Genotypic and phenotypic characterization of the histoblood group ABO(H) in primary bladder tumors. *Int J Cancer* 75, 819-824.
- Orntoft, T. F., Nielsen, M. J., Wolf, H., Olsen, S., Clausen, H., Hakomori, S., and Dabelsteen, E. (1987). Blood group ABO and Lewis antigen expression during neoplastic progression of human urothelium. Immunohistochemical study of type 1 chain structures. *Cancer* 60, 2641-2648.
- Orntoft, T. F., Vestergaard, E. M., Holmes, E., Jakobsen, J. S., Grunnet, N., Mortensen, M., Johnson, P., Bross, P., Gregersen, N., Skorstengaard, K., *et al.* (1996). Influence of Lewis alpha1-3/4-L-fucosyltransferase (FUT3) gene mutations on enzyme activity, erythrocyte phenotyping, and circulating tumor marker sialyl-Lewis a levels. *J Biol Chem* 271, 32260-32268.
- Orntoft, T. F., Wolf, H., Clausen, H., Dabelsteen, E., and Hakomori, S. (1989). Blood group ABH-related antigens in normal and malignant bladder urothelium: possible structural basis for the deletion of type-2 chain ABH antigens in invasive carcinomas. *Int J Cancer* 43, 774-780.
- Osaki, T., Yamaguchi, H., Taguchi, H., Fukuda, M., Kawakami, H., Hirano, H., Watanabe, S., Takagi, A., and Kamiya, S. (1998). Establishment and characterisation of a monoclonal antibody to inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells. *J Med Microbiol* 47, 505-512.

- Parekh, V. V., Singh, A. K., Wilson, M. T., Olivares-Villagomez, D., Bezbradica, J. S., Inazawa, H., Ehara, H., Sakai, T., Serizawa, I., Wu, L., *et al.* (2004). Quantitative and qualitative differences in the in vivo response of NKT cells to distinct alpha- and beta-anomeric glycolipids. *J Immunol* 173, 3693-3706.
- Park, J. J., Kang, S. J., De Silva, A. D., Stanic, A. K., Casorati, G., Hachey, D. L., Cresswell, P., and Joyce, S. (2004). Lipid-protein interactions: biosynthetic assembly of CD1 with lipids in the endoplasmic reticulum is evolutionarily conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1022-1026.
- Pasquier, B., Yin, L., Fondaneche, M. C., Relouzat, F., Bloch-Queyrat, C., Lambert, N., Fischer, A., de Saint-Basile, G., and Latour, S. (2005). Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* 201, 695-701.
- Patenaude, S. I., Seto, N. O., Borisova, S. N., Szpacenko, A., Marcus, S. L., Palcic, M. M., and Evans, S. V. (2002). The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat Struct Biol* 9, 685-690.
- Pellicci, D. G., Hammond, K. J., Uldrich, A. P., Baxter, A. G., Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2002). A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* 195, 835-844.
- Pellicci, D. G., Uldrich, A. P., Kyparissoudis, K., Crowe, N. Y., Brooks, A. G., Hammond, K. J., Sidobre, S., Kronenberg, M., Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2003). Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* 33, 1816-1823.
- Perlman, E. J., and Epstein, J. I. (1990). Blood group antigen expression in dysplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol* 14, 810-818.
- Peter-Katalinic, J. (2005). Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol* 405, 139-171.
- Platt, J. L. (1994). A perspective on xenograft rejection and accommodation. *Immunol Rev* 141, 127-149.
- Pour, P. M., Tempero, M. M., Takasaki, H., Uchida, E., Takiyama, Y., Burnett, D. A., and Steplewski, Z. (1988). Expression of blood group-related antigens ABH, Lewis A, Lewis B, Lewis X, Lewis Y, and CA 19-9 in pancreatic cancer cells in comparison with the patient's blood group type. *Cancer Res* 48, 5422-5426.
- Preece, A. F., Strahan, K. M., Devitt, J., Yamamoto, F., and Gustafsson, K. (2002). Expression of ABO or related antigenic carbohydrates on viral envelopes leads to neutralization in the presence of serum containing specific natural antibodies and complement. *Blood* 99, 2477-2482.
- Raman, R., Raguram, S., Venkataraman, G., Paulson, J. C., and Sasisekharan, R. (2005). Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nat Methods* 2, 817-824.
- Rapoport, E., and Pendu, J. L. (1999). Glycosylation alterations of cells in late phase apoptosis from colon carcinomas. *Glycobiology* 9, 1337-1345.
- Ravn, V., and Dabelsteen, E. (2000). Tissue distribution of histo-blood group antigens. *Apmis* 108, 1-28.
- Roark, J. H., Park, S. H., Jayawardena, J., Kavita, U., Shannon, M., and Bendelac, A. (1998). CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* 160, 3121-3127.
- Rowe, A., Obeiro, J., Newbold, C. I., and Marsh, K. (1995). Plasmodium falciparum rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun* 63, 2323-2326.
- Sadahira, Y., Yasuda, T., and Kimoto, T. (1991). Regulation of Forssman antigen expression during maturation of mouse stromal macrophages in haematopoietic foci. *Immunology* 73, 498-504.
- Salamone, M. C., Rabinovich, G. A., Mendiguren, A. K., Salamone, G. V., and Fainboim, L. (2001). Activation-induced expression of CD1d antigen on mature T cells. *J Leukoc Biol* 69, 207-214.

- Sandberg, J. K., Bhardwaj, N., and Nixon, D. F. (2003). Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment. *Eur J Immunol* *33*, 588-596.
- Sandhoff, K., van Echten, G., Schroder, M., Schnabel, D., and Suzuki, K. (1992). Metabolism of glycolipids: the role of glycolipid-binding proteins in the function and pathobiochemistry of lysosomes. *Biochem Soc Trans* *20*, 695-699.
- Sarode, R., Goldstein, J., Sussman, II, Nagel, R. L., and Tsai, H. M. (2000). Role of A and B blood group antigens in the expression of adhesive activity of von Willebrand factor. *Br J Haematol* *109*, 857-864.
- Scharfman, A., Arora, S. K., Delmotte, P., Van Brussel, E., Mazurier, J., Ramphal, R., and Roussel, P. (2001). Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* *69*, 5243-5248.
- Scharfman, A., Delmotte, P., Beau, J., Lamblin, G., Roussel, P., and Mazurier, J. (2000). Sialyl-Le(x) and sulfosialyl-Le(x) determinants are receptors for *P. aeruginosa*. *Glycoconj J* *17*, 735-740.
- Schoentag, R., Primus, F. J., and Kuhns, W. (1987). ABH and Lewis blood group expression in colorectal carcinoma. *Cancer Res* *47*, 1695-1700.
- Seymour, R. M., Allan, M. J., Pomiankowski, A., and Gustafsson, K. (2004). Evolution of the human ABO polymorphism by two complementary selective pressures. *Proc Biol Sci* *271*, 1065-1072.
- Shetterly, S., Tom, I., Yen, T. Y., Joshi, R., Lee, L., Wang, P. G., and Macher, B. A. (2001). Alpha 1,3 galactosyltransferase: new sequences and characterization of conserved cysteine residues. *Glycobiology* *11*, 645-653.
- Shigyo, Y., Mori, T., and Kano, K. (1986). Forssman antigen on yolk sac derived rat tumor cells. *Immunol Invest* *15*, 25-33.
- Shin, T., Nakayama, T., Akutsu, Y., Motohashi, S., Shibata, Y., Harada, M., Kamada, N., Shimizu, C., Shimizu, E., Saito, T., *et al.* (2001). Inhibition of tumor metastasis by adoptive transfer of IL-12-activated Valpha14 NKT cells. *Int J Cancer* *91*, 523-528.
- Sidobre, S., Naidenko, O. V., Sim, B. C., Gascoigne, N. R., Garcia, K. C., and Kronenberg, M. (2002). The V alpha 14 NKT cell TCR exhibits high-affinity binding to a glycolipid/CD1d complex. *J Immunol* *169*, 1340-1348.
- Sim, B. C., Holmberg, K., Sidobre, S., Naidenko, O., Niederberger, N., Marine, S. D., Kronenberg, M., and Gascoigne, N. R. (2003). Surprisingly minor influence of TRAV11 (Valpha14) polymorphism on NK T-receptor mCD1/alpha-galactosylceramide binding kinetics. *Immunogenetics* *54*, 874-883.
- Singh, A. K., Wilson, M. T., Hong, S., Olivares-Villagomez, D., Du, C., Stanic, A. K., Joyce, S., Sriram, S., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. (2001). Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* *194*, 1801-1811.
- Singh, N., Hong, S., Scherer, D. C., Serizawa, I., Burdin, N., Kronenberg, M., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. (1999). Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol* *163*, 2373-2377.
- Skovlund, V. R. (1997). ABH and related histo-blood group antigens in normal & malignant human endometrium in relation to genetic and hormonal factors. *APMIS Suppl* *69*, 1-33.
- Slomiany, B. L., Slomiany, A., and Horowitz, M. I. (1974). Characterization of blood-group-H-active ceramide tetrasaccharide from hog-stomach mucosa. *Eur J Biochem* *43*, 161-165.
- Smyth, M. J., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* *13*, 459-463.

- Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C. H., Westover, B. P., Weatherford, J., Buhler, J. D., and Gordon, J. I. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* *307*, 1955-1959.
- Sotto, A., Cabrera, S., Castro, J., Borbolla, E., Gonzalez, N., and Pomar, F. (1983). Blood groups in recurrent giardiasis. *Lancet* *2*, 1312-1313.
- Souto, J. C., Almasy, L., Muniz-Diaz, E., Soria, J. M., Borrell, M., Bayen, L., Mateo, J., Madoz, P., Stone, W., Blangero, J., and Fontcuberta, J. (2000). Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII, and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *20*, 2024-2028.
- Spada, F. M., Borriello, F., Sugita, M., Watts, G. F., Koezuka, Y., and Porcelli, S. A. (2000). Low expression level but potent antigen presenting function of CD1d on monocyte lineage cells. *Eur J Immunol* *30*, 3468-3477.
- Spiro, R. G., and Bhoyroo, V. D. (1984). Occurrence of alpha-D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species. Localization in the saccharide chains of the complex carbohydrate units. *J Biol Chem* *259*, 9858-9866.
- Stanic, A. K., De Silva, A. D., Park, J. J., Sriram, V., Ichikawa, S., Hirabayashi, Y., Hayakawa, K., Van Kaer, L., Brutkiewicz, R. R., and Joyce, S. (2003). Defective presentation of the CD1d1-restricted natural Va14Ja18 NKT lymphocyte antigen caused by beta-D-glucosylceramide synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 1849-1854.
- Stapleton, A., Nudelman, E., Clausen, H., Hakomori, S., and Stamm, W. E. (1992). Binding of uropathogenic *Escherichia coli* R45 to glycolipids extracted from vaginal epithelial cells is dependent on histo-blood group secretor status. *J Clin Invest* *90*, 965-972.
- Stenersen, T. C., and Dabelsteen, E. (1992). Changes in the glycosylation pattern of histo-blood group antigens in benign, premalignant and malignant laryngeal epithelial lesions. *APMIS Suppl* *27*, 139-148.
- Steuer, M. K., Beuth, J., Hofstadter, F., Probster, L., Ko, H. L., Pulverer, G., and Strutz, J. (1995). Blood group phenotype determines lectin-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human outer ear canal epithelium. *Zentralbl Bakteriell* *282*, 287-295.
- Stewart, T. J., Smyth, M. J., Fernando, G. J., Frazer, I. H., and Leggatt, G. R. (2003). Inhibition of early tumor growth requires J alpha 18-positive (natural killer T) cells. *Cancer Res* *63*, 3058-3060.
- Stinnakre, M. G., Evans, M. J., Willison, K. R., and Stern, P. L. (1981). Expression of Forssman antigen in the post-implantation mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol* *61*, 117-131.
- Sung, S. S., and Sweeley, C. C. (1979). The structure of canine intestinal trihexosylceramide. *Biochim Biophys Acta* *575*, 295-298.
- Szulman, A. E. (1964). The Histological Distribution of the Blood Group Substances in Man as Disclosed by Immunofluorescence. Iii. the a, B, and H Antigens in Embryos and Fetuses from 18 Mm in Length. *J Exp Med* *119*, 503-516.
- Taniguchi, N., Yokosawa, N., Narita, M., Mitsuyama, T., and Makita, A. (1981). Expression of Forssman antigen synthesis and degradation in human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* *67*, 577-583.
- Tauchi, K., Kakudo, K., Machimura, T., Makuuchi, H., and Mitomi, T. (1991). Immunohistochemical studies of blood group-related antigens in human superficial esophageal carcinomas. *Cancer* *67*, 3042-3050.
- Taylor, D. E., Rasko, D. A., Sherburne, R., Ho, C., and Jewell, L. D. (1998). Lack of correlation between Lewis antigen expression by *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells in infected patients. *Gastroenterology* *115*, 1113-1122.
- Taylor, S. G., McKenzie, I. F., and Sandrin, M. S. (2003). Characterization of the rat alpha(1,3)galactosyltransferase: evidence for two independent genes encoding glycosyltransferases that synthesize Galalpha(1,3)Gal by two separate glycosylation pathways. *Glycobiology* *13*, 327-337.

- Thomas, S. Y., Hou, R., Boyson, J. E., Means, T. K., Hess, C., Olson, D. P., Strominger, J. L., Brenner, M. B., Gumperz, J. E., Wilson, S. B., and Luster, A. D. (2003). CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol* *171*, 2571-2580.
- Toura, I., Kawano, T., Akutsu, Y., Nakayama, T., Ochiai, T., and Taniguchi, M. (1999). Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J Immunol* *163*, 2387-2391.
- Trangle, K. L., Goluska, M. J., O'Leary, M. J., and Douglas, S. D. (1979). Distribution of blood groups and secretor status in schistosomiasis. *Parasite Immunol* *1*, 133-140.
- Trinchera, M., Fabbri, M., and Ghidoni, R. (1991). Topography of glycosyltransferases involved in the initial glycosylations of gangliosides. *J Biol Chem* *266*, 20907-20912.
- Trombetta, E. S., and Helenius, A. (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* *8*, 587-592.
- Uemura, K., Hattori, H., Ono, K., Ogata, H., and Taketomi, T. (1989). Expression of Forssman glycolipid and blood group-related antigens A, Le(x), and Le(y) in human gastric cancer and in fetal tissues. *Jpn J Exp Med* *59*, 239-249.
- Ura, Y., Dion, A. S., Williams, C. J., Olsen, B. D., Redfield, E. S., Ishida, M., Herlyn, M., and Major, P. P. (1992). Quantitative dot blot analyses of blood-group-related antigens in paired normal and malignant human breast tissues. *Int J Cancer* *50*, 57-63.
- van den Elzen, P., Garg, S., Leon, L., Brigl, M., Leadbetter, E. A., Gumperz, J. E., Dascher, C. C., Cheng, T. Y., Sacks, F. M., Illarionov, P. A., *et al.* (2005). Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* *437*, 906-910.
- van Der Vliet, H. J., Nishi, N., de Gruijl, T. D., von Blomberg, B. M., van den Eertwegh, A. J., Pinedo, H. M., Giaccone, G., and Scheper, R. J. (2000). Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth. *Blood* *95*, 2440-2442.
- Varki, A., and Kornfeld, S. (1980). Structural studies of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J Biol Chem* *255*, 10847-10858.
- Vierbuchen, M., Larena, A., Schroder, S., Hanisch, F. G., Ortmann, M., Larena, A., Uhlenbruck, G., and Fischer, R. (1992). Blood group antigen expression in medullary carcinoma of the thyroid. An immunohistochemical study on the occurrence of type 1 chain-derived antigens. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* *62*, 79-88.
- Vincent, M. S., Leslie, D. S., Gumperz, J. E., Xiong, X., Grant, E. P., and Brenner, M. B. (2002). CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* *3*, 1163-1168.
- Vowden, P., Lowe, A. D., Lennox, E. S., and Bleehen, N. M. (1986). The expression of ABH and Y blood group antigens in benign and malignant breast tissue: the preservation of the H and Y antigens in malignant epithelium. *Br J Cancer* *53*, 313-319.
- Wang, B., Geng, Y. B., and Wang, C. R. (2001). CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med* *194*, 313-320.
- Wang, G., Ge, Z., Rasko, D. A., and Taylor, D. E. (2000). Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation. *Mol Microbiol* *36*, 1187-1196.
- Welshinger, M., Finstad, C. L., Venkatraman, E., Federici, M. G., Rubin, S. C., Lewis, J. L., Jr., and Lloyd, K. O. (1996). Expression of A, B, and H blood group antigens in epithelial ovarian cancer: relationship to tumor grade and patient survival. *Gynecol Oncol* *62*, 106-112.

Whincup, P. H., Cook, D. G., Phillips, A. N., and Shaper, A. G. (1990). ABO blood group and ischaemic heart disease in British men. *Bmj* 300, 1679-1682.

Wilson, M. T., Johansson, C., Olivares-Villagomez, D., Singh, A. K., Stanic, A. K., Wang, C. R., Joyce, S., Wick, M. J., and Van Kaer, L. (2003). The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10913-10918.

Wilson, S. B., Kent, S. C., Patton, K. T., Orban, T., Jackson, R. A., Exley, M., Porcelli, S., Schatz, D. A., Atkinson, M. A., Balk, S. P., *et al.* (1998). Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391, 177-181.

Wirth, H. P., Yang, M., Peek, R. M., Jr., Tham, K. T., and Blaser, M. J. (1997). Helicobacter pylori Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. *Gastroenterology* 113, 1091-1098.

Wong, F. L., Kodama, K., Sasaki, H., Yamada, M., and Hamilton, H. B. (1992). Longitudinal study of the association between ABO phenotype and total serum cholesterol level in a Japanese cohort. *Genet Epidemiol* 9, 405-418.

Woolhouse, M. E., Webster, J. P., Domingo, E., Charlesworth, B., and Levin, B. R. (2002). Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nat Genet* 32, 569-577.

Wu, D. Y., Segal, N. H., Sidobre, S., Kronenberg, M., and Chapman, P. B. (2003). Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med* 198, 173-181.

Xu, H., Storch, T., Yu, M., Elliott, S. P., and Haslam, D. B. (1999). Characterization of the human Forssman synthetase gene. An evolving association between glycolipid synthesis and host-microbial interactions. *J Biol Chem* 274, 29390-29398.

Yamamoto, F. (1995). Molecular genetics of the ABO histo-blood group system. *Vox Sang* 69, 1-7.

Yamamoto, F. (2000). Molecular genetics of ABO. *Vox Sang* 78 Suppl 2, 91-103.

Yamamoto, F., and Hakomori, S. (1990). Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J Biol Chem* 265, 19257-19262.

Yamamoto, F., Marken, J., Tsuji, T., White, T., Clausen, H., and Hakomori, S. (1990). Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1----2Gal alpha 1----3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J Biol Chem* 265, 1146-1151.

Yamamoto, H., Iida-Tanaka, N., Kasama, T., Ishizuka, I., Kushi, Y., and Handa, S. (1999). Isolation and characterization of a novel Forssman active acidic glycosphingolipid with branched isoglobo-, ganglio-, and neolacto-series hybrid sugar chains. *J Biochem (Tokyo)* 125, 923-930.

Yamamoto, M., Lin, X. H., Kominato, Y., Hata, Y., Noda, R., Saitou, N., and Yamamoto, F. (2001). Murine equivalent of the human histo-blood group ABO gene is a cis-AB gene and encodes a glycosyltransferase with both A and B transferase activity. *J Biol Chem* 276, 13701-13708.

Yamashita, Y., Chung, Y. S., Horie, R., Kannagi, R., and Sowa, M. (1995). Alterations in gastric mucin with malignant transformation: novel pathway for mucin synthesis. *J Natl Cancer Inst* 87, 441-446.

Yang, J. M., Byrd, J. C., Siddiki, B. B., Chung, Y. S., Okuno, M., Sowa, M., Kim, Y. S., Matta, K. L., and Brockhausen, I. (1994). Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology* 4, 873-884.

Yazer, M. H., and Palcic, M. M. (2005). The importance of disordered loops in ABO glycosyltransferases. *Transfus Med Rev* 19, 210-216.

Yokota, M., Yane, K., Tanaka, O., Miyahara, H., and Matsunaga, T. (1994). [Aberrant expression of carbohydrate antigens in squamous cell carcinoma of the tongue]. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 97, 218-225.

Yoshimoto, T., Bendelac, A., Hu-Li, J., and Paul, W. E. (1995). Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4⁺, NK1.1⁺ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 11931-11934.

Yoshimoto, T., Min, B., Sugimoto, T., Hayashi, N., Ishikawa, Y., Sasaki, Y., Hata, H., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., *et al.* (2003). Nonredundant roles for CD1d-restricted natural killer T cells and conventional CD4⁺ T cells in the induction of immunoglobulin E antibodies in response to interleukin 18 treatment of mice. *J Exp Med* *197*, 997-1005.

Yoshimoto, T., and Paul, W. E. (1994). CD4^{pos}, NK1.1^{pos} T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* *179*, 1285-1295.

Yowler, B. C., Kensinger, R. D., and Schengrund, C. L. (2002). Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I. *J Biol Chem* *277*, 32815-32819.

Yu, K. O., Im, J. S., Molano, A., Dutronc, Y., Illarionov, P. A., Forestier, C., Fujiwara, N., Arias, I., Miyake, S., Yamamura, T., *et al.* (2005). Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 3383-3388.

Yuan, M., Itzkowitz, S. H., Palekar, A., Shamsuddin, A. M., Phelps, P. C., Trump, B. F., and Kim, Y. S. (1985). Distribution of blood group antigens A, B, H, Lewis^a, and Lewis^b in human normal, fetal, and malignant colonic tissue. *Cancer Res* *45*, 4499-4511.

Zeng, Z., Castano, A. R., Segelke, B. W., Stura, E. A., Peterson, P. A., and Wilson, I. A. (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* *277*, 339-345.

Zheng, P. Y., Hua, J., Yeoh, K. G., and Ho, B. (2000). Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not cagA, iceA, and vacA in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. *Gut* *47*, 18-22.

Zhou, D., Cantu, C., 3rd, Sagiv, Y., Schrantz, N., Kulkarni, A. B., Qi, X., Mahuran, D. J., Morales, C. R., Grabowski, G. A., Benlagha, K., *et al.* (2004a). Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins. *Science* *303*, 523-527.

Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., 3rd, Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y. P., Yamashita, T., *et al.* (2004b). Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* *306*, 1786-1789.

Zisman, M. (1977). Blood-group A and giardiasis. *Lancet* *2*, 1285.

Identification de nouveaux membres de la famille 6 des glycosyltransférases (GT6) et rôle d'un membre de cette famille dans la synthèse du ligand des lymphocytes NKTi

Les glycosyltransférases impliquées dans la production de glycoconjugués sont regroupées en familles définies selon leurs caractéristiques. Lors de ma thèse, je me suis intéressée à la famille GT6 dont quatre membres sont connus : les glycosyltransférases A et B, l'alpha 3 galactosyltransférase, la Forssman synthase et l'iGb3 synthase. Nous avons identifié de nouveaux membres de la famille : la glycosyltransférase B de rat, GT6m5, GT6m6 et GT6m7, et proposé un modèle évolutif de la famille. Par la suite, j'ai étudié un membre de la famille GT6 : l'iGb3 synthase. L'iGb3 est un ligand endogène murin des NKTi (Natural Killer T). Nous avons étudié l'expression de l'iGb3 sur des lignées tumorales humaines et son implication dans l'activation des NKTi mais aucun résultat ne permet d'affirmer qu'il serait le ligand endogène des NKTi humains. Néanmoins, leur activation par des lignées tumorales en absence de ligand exogène laisse penser qu'il existe au moins un autre ligand endogène des NKTi.

galactosyltransférase, ABO, iGb3, NKT

Identification of novel members of the glycosyltransferases 6 family (GT6) and role of one member of this family in the synthesis of NKTi cells ligand

Glycosyltransferases involved in glycoconjugates synthesis can be classified in families, depending on their characteristics. During my thesis, I was interesting in family GT6 of which four members are known: A and B glycosyltransferases, alpha 3 galactosyltransferase, Forssman synthase and iGb3 synthase. We have identified four novel members of this family: rat B glycosyltransferase, GT6m5, GT6m6 and GT6m7, and proposed an evolution model for this family. Then, I studied one member of this family: iGb3 synthase. iGb3 is one endogene ligand of mouse NKTi (Natural Killer T cells). We studied iGb3 expression on tumour cell lines and its implication in NKTi activation but we were not able to prove that it is the endogene ligand of human NKTi. Nevertheless, their activation with tumour cells without exogene ligand allows us to propose that at least one other endogene ligand of NKTi exists.

galactosyltransferase, ABO, iGb3, NKT

TURCOT-DUBOIS Anne-Laure
276, rue Richelieu
85170 LES LUCS SUR BOULOGNE