

## Identification du locus *Cmv1* : bases génétiques de la susceptibilité aux cytomégalovirus

Le cytomégalovirus (CMV) humain, membre de la famille des herpès virus, infecte plus de 70 % des personnes dans le monde [1]. Souvent à l'origine d'infections latentes, le CMV est le chef de file des maladies virales congénitales et il est responsable de maladies sévères et mortelles chez les patients immunodéficients. Pourquoi certains individus sont-ils résistants et d'autres sensibles à l'infection par CMV ? Le statut immunologique et le bagage génétique de la personne hôte sont les facteurs clés qui détermineront l'apparition de la maladie. L'étude des déterminants innés de la susceptibilité au CMV a été facilitée par l'analyse de modèles expérimentaux d'infection dans les lignées de souris pures.

Deux types différents de réponses durant la phase précoce de l'infection vont déterminer le statut de résistance ou de sensibilité au CMV dans les lignées de souris. Ainsi, dans les lignées résistantes, la réplication virale est limitée, alors que dans les lignées sensibles, on assiste à une réplication virale importante dans certains organes cibles notamment la rate. La charge virale durant la phase précoce est contrôlée par un locus, *Cmv1*, présent sous deux formes alléliques : *Cmv1<sup>r</sup>*, l'allèle dominant de résistance, qui caractérise la lignée C57BL/6 (B6) et *Cmv1<sup>s</sup>*, l'allèle récessif de susceptibilité, porté par la lignée DBA/2 [2]. La résistance des souris B6 n'est pas abolie par l'absence de lymphocytes T ou B, mais en revanche, l'élimination des cellules NK1.1<sup>+</sup> les rend sensibles à l'infection, indiquant un contrôle génétique de *Cmv1* dans les cellules NK1.1<sup>+</sup> [3]. L'antigène NK1.1 est un récepteur exprimé par ces cellules

cytotoxiques naturelles NK (*natural killer*) et par d'autres populations lymphocytaires. Les cellules NK reconnaissent et détruisent les cellules anormales grâce à des récepteurs de surface, qui déclenchent une cascade d'événements conduisant à l'activité cytotoxique [4, 5]. C'est une expression aberrante des molécules du CMH de classe I, fréquemment observée dans les cellules tumorales ou infectées par des virus, qui déclenche l'activité cytotoxique des cellules NK [4]. Chez la souris, la majorité des récepteurs connus exprimés par les cellules NK appartient à la superfamille des lectines dimériques de type C, KLR (*killer lectin-type receptors*), dont les gènes sont génétiquement liés dans une région du chromosome 6 de la souris, le complexe génique de la cellule NK (NKC, *natural killer gene complex*) [5]. Ce complexe comprend, entre autres, les familles *Nk1* (*Klrk1*) dont fait partie l'antigène NK1.1, *Nkg2* (*Klrk2*) et *Ly49* (*Klra1*) (figure 1). Chaque famille code pour des membres activateurs ou inhibiteurs de la cytolyse, mais tandis que certains reconnaissent des sucres (KLRB), d'autres interagissent avec des molécules du CMH de classe I (KLRC et KLRA). Il était intéressant de constater que *Cmv*, mais aussi les locus de susceptibilité à *Leishmania* (*Scl*), au virus ectromelia (*Rmp1*) ou encore *Chok*, un locus contrôlant l'activité anti-tumorale des cellules NK sont localisés dans ce complexe NKC (figure 1) [5, 6]. Les conséquences cellulaires de l'expression de ces locus mettent en jeu des cellules NK. Mais quel serait le gène correspondant à *Cmv1* ? serait-il impliqué dans tous les phénotypes associés au NKC ?

Nous avons identifié, par clonage positionnel, le locus de *cmv1* dans un intervalle génétique de 0,35 cM qui s'est avéré correspondre à un segment de 1,6 Mb d'ADN génomique (figure 1) [7]. L'analyse de cette région a permis d'exclure de nombreux gènes candidats, comme par exemple les *Klrk* et *Klrc*, et d'élaborer une carte de transcription identifiant au moins 18 transcrits dont les 14 membres de la famille *Klra*. Toutefois, la présence des variants alléliques, les variations dans le nombre et l'ordre des gènes *Klra* observées entre les lignées pures de souris rendaient très difficile l'identification d'une mutation associée avec *Cmv1* (voir haplotypes dans la figure 1). Nous avons tiré parti de l'existence d'une lignée recombinante BXD-8, issue de parents B6 et DBA/2, qui était sensible à l'infection malgré la présence du NKC hérité de la souche résistante B6. Cette observation suggérait qu'une mutation spontanée était survenue dans *cmv1*, à l'origine du nouvel allèle *Cmv1<sup>r</sup>* [8]. Cette hypothèse a été confirmée par l'identification d'une délétion de 23 kb incluant le gène *Klra8* dans la lignée BXD-8 (figure 1), et par l'absence de l'expression de ce gène. Parallèlement, l'analyse des cellules BXD-8 avec une panoplie d'anticorps monoclonaux dirigés contre des récepteurs du NKC a révélé l'absence du récepteur KLRA8 [9]. La conversion de la souche résistante en une souche sensible par l'administration d'anticorps spécifiques de KLRA8 offrait un argument supplémentaire en faveur de l'association entre l'absence de KLRA8 et la susceptibilité au CMV, confirmant l'identité de *Cmv1* et *Klra8*. Contrairement à la majorité des

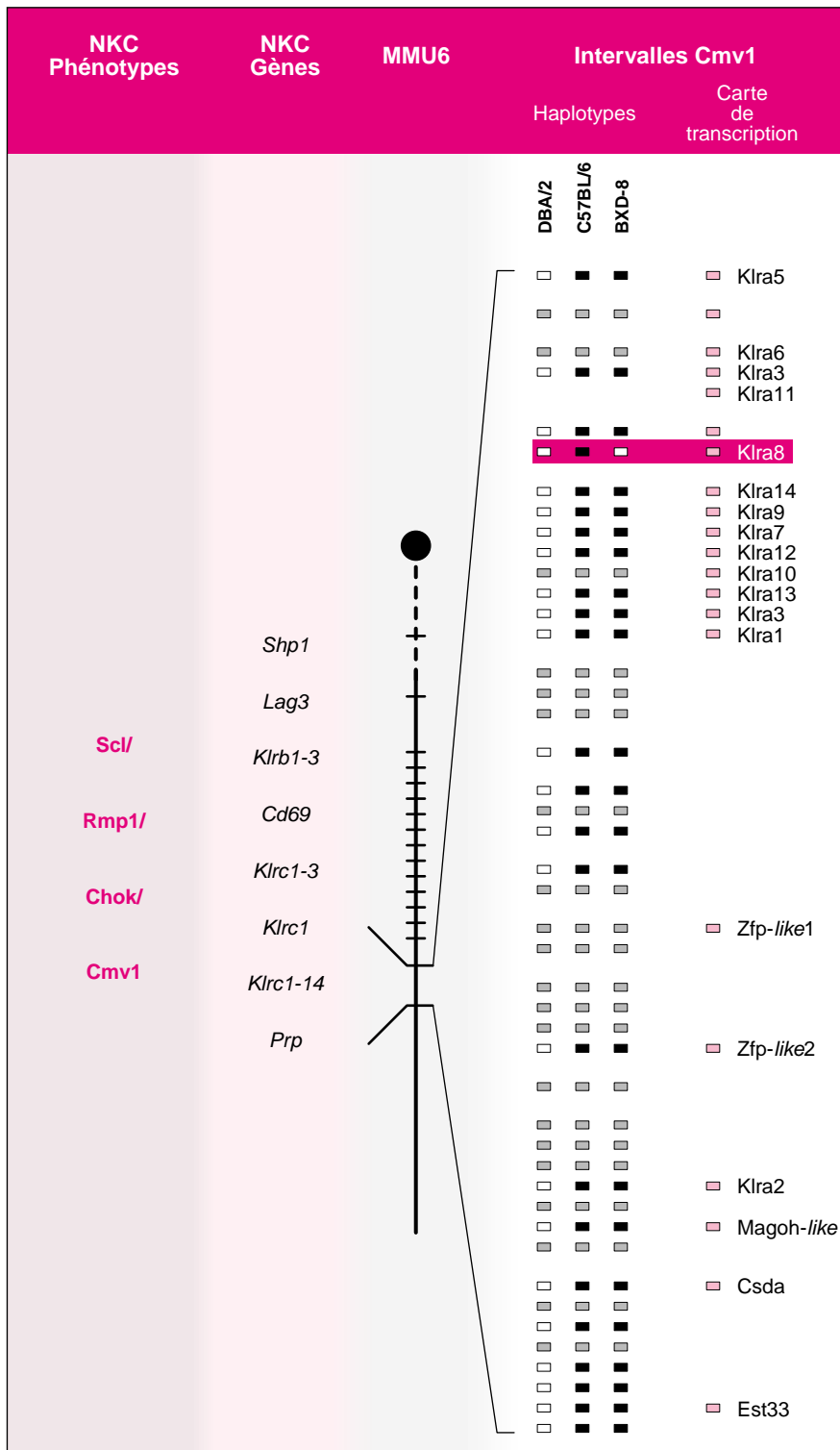


Figure 1. **Cartographie du Complexe génique de la cellule NK (NKC) et du locus Cmv1.** Le NKC est cartographié dans la région distale du chromosome 6 de la souris (MMU6). Cette région comprend des gènes codant pour des protéines importantes pour la reconnaissance du soi et l'élimination de cellules anormales comme les KLR (voir texte), la phosphatase hématopoïétique Shp1 et le récepteur Lag3 (lymphocyte-activation gene 3), ainsi que des locus définis phénotypiquement à partir des fonctions de défense de l'hôte (phénotypes, en rouge). Chok contrôle l'activité tumoricide des cellules NK, tandis que Scl contrôle la susceptibilité au *Leishmania major*, Rmp1 au virus ectromelia et Cmv1 au cytomégalo-virus. L'intervalle génétique pour Cmv1, défini par Klr1 et Prp, est agrandi à droite de la figure. Cet intervalle correspond à 1,6 Mb d'ADN génomique. Les haplotypes pour les lignés sensibles (DBA/2 et BXD-8) et résistantes (C57BL/6) à l'infection ont été construits par génotypage des sondes polymorphes (rectangles blancs, origine DBA/2 et noirs, origine C57BL/6) et non-polymorphes (rectangles gris). Les marqueurs sont cartographiés vis-à-vis d'une carte de transcription montrant les gènes candidats pour Cmv1 (rectangles roses). Le grand rectangle rouge indique la position du gène Klr8 dont l'absence détermine la susceptibilité au cytomégalo-virus.

récepteurs KLR qui s'expriment dans plusieurs types lymphocytaires, l'expression de l'activateur KLRA8 est restreinte aux cellules NK [10]. Un acide aminé chargé dans la

région transmembranaire de KLRA8 permet son association à la protéine DAP-12, transductrice de signaux cytolytiques par l'intermédiaire d'un motif intracellulaire ITAM (*immunore-*

*ceptor tyrosine-based activation motif*) [11]. Ces résultats permettent d'envisager un modèle dans lequel la résistance s'exercerait à un stade précoce de l'infection par l'intermédiaire d'une cytolysse des cellules infectées via KLRA8. L'absence de KLRA8 dans les lignées sensibles favoriserait une amplification incontrôlée de la réplication virale. Ainsi, l'identification de KLRA8 comme médiateur de la résistance au CMV apporte la première preuve génétique du rôle clé joué par les cellules NK dans l'infection par CMV (figure 2). Ce résultat clarifie aussi la relation entre les différents phénotypes du NKC. Par exemple, on sait aujourd'hui que *Chok* est identique au récepteur activateur KLRA4 [6], que *Cmv1* est dif-

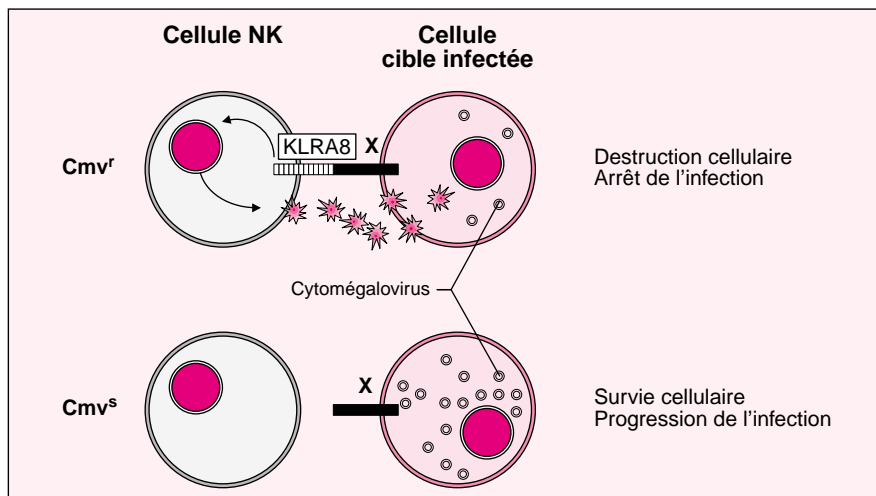


Figure 2. L'expression de KLR A8 est essentielle à la reconnaissance et à la destruction des cellules cibles infectées par le CMV. L'interaction du récepteur KLR A8 avec un ligand (x), d'origine virale ou endogène, induit des signaux d'activation de la cytotoxicité des cellules NK dirigée contre les cellules infectées.

5. Brown MG, Scalzo AA, Matsumoto K, Yokoyama WM. The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* 1997; 155: 53-65.
6. Idris AH, Smith HR, Mason LH, et al. The natural killer gene complex genetic locus *Chok* encodes Ly-49D, a target recognition receptor that activates natural killing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6330-5.
7. Depatie C, Lee SH, Stafford A, et al. Sequence-ready BAC contig, physical, and transcriptional map of a 2-Mb region overlapping the mouse chromosome 6 host-resistance locus *Cmv1*. *Genomics* 2000; 66: 161-74.
8. Lee SH, Girard S, Macina D, et al. Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nat Genet* 2001; 28: 42-5.
9. Brown MG, Dokun AO, Heusel JW, et al. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 2001; 292: 934-7.
10. Smith HR, Chuang HH, Wang LL, et al. Nonsynchronous coexpression of activation receptors on murine natural killer cells. *J Exp Med* 2000; 191: 1341-54.
11. Gosselin P, Mason LH, Willette-Brown J, et al. Induction of DAP12 phosphorylation, calcium mobilization, and cytokine secretion by Ly49H. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 165-71.
12. Farrell H, Degli-Esposti M, Densley E, et al. Cytomegalovirus MHC class I homologues and natural killer cells: an overview. *Microbes Infect* 2000; 2: 521-32.
13. Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 2000; 12: 721-7.

férent de *Rmp1* [8], puisque la souche BXD-8 est résistante à l'infection avec ectromelia, suggérant ainsi que différents membres du NKC contribueraient indépendamment aux diverses fonctions des cellules NK dans l'immunité naturelle, en reconnaissant des motifs spécifiques. Le ligand de KLR A8 est-il d'origine virale ou cellulaire? De par leurs homologues avec les molécules du CMH de classe I, gpm144 [12] serait un ligand candidat d'origine virale alors que des protéines induites par l'infection virale, comme RAE-1 (*retinoic acid early inducible*) et H60 (un antigène d'histocompatibilité mineur) [13] seraient des candidats cellulaires. Est-ce qu'un mécanisme de résistance semblable existe chez l'homme? Quoiqu'il n'existe pas d'orthologue humain pour KLR A8, des homologues fonctionnels ont été

identifiés dans la région q13.4 du chromosome 19, et parmi eux, la famille des gènes KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*) [4] dont un des membres pourrait déceler le CMV humain!

1. Rawlinson WD. Broadsheet. Number 50: diagnosis of human cytomegalovirus infection and disease. *Pathology* 1999; 31: 109-15.
2. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Simmons A La Vista AB, Shellam GR. *Cmv1*, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med* 1990; 171: 1469-83.
3. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Wallace CR, et al. The effect of the *Cmv1* resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol* 1992; 149: 581-9.
4. Schleinitz N, Lopez F, Vivier E. Cellules natural killer: tuer ou ne pas tuer. *Med Sci* 2001; 17: 504-9.

#### Abdelmajid Belouchi

Galileo Genomics Inc., 6700, Ave. du Parc, Montréal, Québec, H2V 4H9, Canada.

#### Silvia M. Vidal

Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, K1H 8M5, Canada.