

2m11.3294.4

Université de Montréal

**HLA-DO, production de molécules solubles
et d'anticorps monoclonaux**

Par
Nathalie Bédard

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie.

Avril, 2005

© Nathalie Bédard, 2005



W

4

U58

2005

V. 133

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**HLA-DO, production de molécules solubles
et d'anticorps monoclonaux**

Présentée par :
Nathalie Bédard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Ali Ahmad
Président-rapporteur
Dr Jacques Thibodeau
Directeur de recherche
Dr Alexei Pshezhetsky
Membre du jury

RÉSUMÉ

Le déclenchement de la réponse immunitaire par la présentation antigénique est indispensable lorsqu'il y a pénétration d'agents pathogènes dans l'organisme. Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) vont internaliser, dégrader et présenter à leur surface des molécules de classe II classiques associées à un peptide antigénique. Ce complexe sera reconnu par les lymphocytes T CD4⁺ et déclenchera une réaction en chaîne menant généralement à l'élimination du pathogène. Les principaux régulateurs de l'apprêtement antigénique sont les molécules de classe II dites non-classiques, HLA-DM (DM) et HLA-DO (DO). En effet, la molécule DM est responsable principalement de l'échange peptidique et cette activité est modulée par DO. Toutefois, dès sa synthèse dans le réticulum endoplasmique (RE), DO doit s'associer à DM pour son transport intracellulaire. De plus cette association permet à DO d'acquérir une conformation stable et éviter ainsi sa dégradation. Tout récemment, notre groupe a démontré qu'une mutation en position P11 au niveau de la chaîne DO α rétablit le repliement adéquat de la molécule et permet à celle-ci de quitter le réticulum endoplasmique (RE) sans subir de dégradation. Dans ces travaux de recherche, la mutation DO α P11V a été utilisée pour produire des molécules de HLA-DO solubles à l'aide d'un système d'expression dans des cellules de drosophile. Ces molécules solubles ont pu être purifiées et injectées à des souris dans le but de créer un anticorps monoclonal dirigé contre DO. Un hybridome produisant un anticorps anti-DO a été identifié. Cet anticorps a été caractérisé et pourra servir à de futures études pour mieux comprendre le rôle de HLA-DO dans la présentation antigénique.

MOTS CLÉS

Présentation antigénique

CMH de classe II

HLA-DO

Anticorps monoclonaux

Cellules de drosophile

Molécules solubles

SUMMARY

The triggering of the immune response by antigenic presentation is essential when there is invasion of pathogenic agents in the body. The antigen presenting cells (APC) internalize, process antigens and present antigenic peptides in association with classical MHC class II molecules. This peptide-MHC complex will be recognized by CD4+ T lymphocytes and will activate a chain reaction generally leading to the elimination of the pathogen. The main regulators of antigen processing are the molecules of class II known as non-classic, HLA-DM (DM) and HLA-DO (DO). Indeed, the molecule DM is mainly responsible for the peptide exchange and this activity is modulated by DO. However, at the time of its synthesis in the endoplasmic reticulum (ER), DO must join DM for its intracellular transport. Moreover, the association with DM allows DO to acquire a stable conformation and avoid degradation. Recently, our group showed that a mutation in P11 position of the DO α chain restores adequate folding up of the molecule and allows it to leave the endoplasmic reticulum (ER) without undergoing degradation. Here, we have used the DO α P11V to produce soluble HLA-DO molecules using a system of expression in *Drosophila* cells. These soluble molecules were purified and injected in mice with the intention of producing a monoclonal antibody against DO. We were able to identify a hybridoma producing an anti-DO antibody. The antibody was characterized and could be used for future studies for better understanding the role of HLA-DO in antigen processing.

KEY WORDS

Antigen presentation

MHC class II

HLA-DO

Drosophila cells

Soluble molecules

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
MOTS CLÉS	ii
SUMMARY	iii
KEY WORDS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
<i>Chapitre 1</i>	<i>viii</i>
<i>Chapitre 2</i>	<i>viii</i>
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
DÉDICACE.....	x
CHAPITRE 1 ; REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1.1 Introduction	2
1.2 Les molécules du CMH de classe II.....	5
1.2.1 Locus du CMH de classe II.....	5
1.2.2 La structure des molécules classiques de CMH de classe II.....	8
1.3 La présentation antigénique.....	11
1.4 La molécule HLA-DM.....	16
1.4.1 Structure et expression de la molécule HLA-DM	16
1.4.2 Fonctions de la molécule HLA-DM.....	16
1.5 La molécule HLA-DO	20
1.5.1 Structure et expression de la molécule HLA-DO	20

1.5.2 <i>Fonctions de la molécule HLA-DO</i>	22
1.6 Molécules solubles	26
1.7 Les anticorps monoclonaux	29
1.8 Objectifs et hypothèses de travail	41
CHAPITRE 2 ; ARTICLE	43
2.1 SUMMARY	45
2.2 RÉSUMÉ	46
2.3 INTRODUCTION	47
2.4 MATERIALS AND METHODS	49
2.4.1 <i>Antibodies</i>	49
2.4.2 <i>Plasmids</i>	49
2.4.3 <i>Cell lines</i>	49
2.4.4 <i>Transfection, selection and expression of soluble HLA-DO molecule</i>	50
2.4.5 <i>Purification of soluble proteins</i>	50
2.4.6 <i>Production and purification of MAbs</i>	51
2.4.7 <i>Western blot, silver staining and immunoprecipitation</i>	52
2.4.8 <i>Flow cytometry</i>	53
2.5 RESULTS	54
2.5.1 <i>Construction of expression vectors carrying truncated HLA-DO genes</i>	54
2.5.2 <i>Expression of sDO and sDOP-V heterodimers in Drosophila melanogaster Schneider cells</i>	55
2.5.3 <i>Conformation of soluble molecules</i>	56
2.5.4 <i>Purification of the NBDO mAb</i>	57

2.5.5 The NBDO antibody consists exclusively of light chains	57
2.6 FIGURES	59
2.7 FIGURES LEGENDS	65
2.8 DISCUSSION	67
2.9 ABBREVIATIONS	71
2.10 REFERENCES	72
CHAPITRE 3 ; DISCUSSION	78
5.1 Les molécules solubles	80
5.2 Système d'expression chez les cellules de drosophile	83
5.3 Production d'un anticorps monoclonal spécifique à HLA-DO	84
CHAPITRE 4 ; CONCLUSION	87
CHAPITRE 5 ; BIBLIOGRAPHIE	90

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1 La présentation antigénique aux lymphocytes T	4
Figure 1.2 Le Locus du complexe majeur d'histocompatibilité humain ..	6
Figure 1.3 Structure de la molécule du CMH de classe II	8
Figure 1.4 Structure de la niche peptidique des molécules du CMH-II	10
Figure 1.5 Structure du trimère et nonamère de Ii et du CMH-II	12
Figure 1.6 Voie endosomale des molécules du CMH de classe II	15
Figure 1.7 Comparaison des niches peptidiques des molécules HLA-DR et HLA-DM	17
Figure 1.8 La voie de la présentation antigénique des molécules du CMH de classe II	19
Figure 1.9 Représentation de la mutation α P11V	25
Figure 1.10 Structure générale d'une immunoglobuline	30
Figure 1.11 Technique d'obtention d'un hybridome producteur d'anticorps monoclonal	33
Figure 1.12 Sélection des hybridomes en milieu HAT	35
Figure 1.13 Production d'anticorps dans un flacon à 2 compartiments	38

Chapitre 2

Figure 1	59
Figure 2	60
Figure 3	61
Figure 4	62
Figure 5	63
Figure 6	64

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Ac : Anticorps

AcM : Anticorps monoclonale

AcP : Anticorps polyclonale

Ag : Antigène

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CLIP : « *Class II-associated invariant chain peptide* »

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMH-II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

DM : HLA-DM

DO : HLA-DO

DR : HLA-DR

DQ : HLA-DQ

HLA : « *Human leukocyte antigen* »

Ig : Immunoglobuline

IgM : Immunoglobuline M

IgG : Immunoglobuline G

IFN- γ : Interféron gamma

kDa : Kilodaltons

Ii : Chaîne invariante (« *Invariable chain* »)

mIlg : Immunoglobuline membranaire

MIIC : « *Major histocompatibility-complex class II compartment* »

RE : Réticulum endoplasmique

RcB : Récepteur des cellules B

RcT : Récepteur des cellules T

DÉDICACE

L'écriture de ce mémoire n'aurait pu se faire sans l'apport de mon entourage et je tiens à les remercier tout particulièrement dans ces brèves lignes. Tout d'abord, mon directeur de recherche, Jacques, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir donné ma chance. Mes parents, qui se sont toujours intéressés à mes projets et pour m'avoir toujours donner beaucoup d'amour. Mon grand frère qui a toujours été et qui sera toujours un modèle pour moi ainsi qu'Eva pour avoir pris la peine de lire ce mémoire ce qui n'est pas une mince tâche. Ensuite, viennent tous les membres présents et anciens du laboratoire dont je vais m'ennuyer énormément. Un gros merci, tout d'abord à Alexzandre qui trouve que je suis la personne la plus « potineuse » qu'il connaisse, Georgio qui lui est la personne la plus attentionnée aux autres que je connaisse, Jes qui est toujours là pour régler n'importe quels des problèmes manuels ou scientifiques, Cat qui est la seule qui puisse comprendre mes états d'âme, Marie-Élaine avec qui j'ai ri beaucoup et que je remercie pour tous les petits services qu'elle m'a rendu. Ensuite viennent tous les anciens du labo, Angie qui est devenue une amie et une collègue de taebo dont je remercie pour son encouragement, Sam avec qui j'aimais bien potiner en prenant un café, Francisco, pour toutes ses blagues et l'ambiance qu'il créait, laissant un grand vide lors de son départ, Jul pour sa spontanéité et sa vie en couleur et, finalement tous les autres, Djibril qui m'a montré comment faire des cristaux et Marie-Hélène pour l'aide de ma première figure. Finalement, ces dernières lignes je les dédis à Michel qui est à mes côtés depuis de nombreuses années maintenant et qui a pu suivre mes peines, mes déceptions mais aussi mes joies et mes satisfactions de toute sorte et qui sera toujours la personne la plus importante dans ma vie. Bref, ceci est pour remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées et que je côtoie encore aujourd'hui.

CHAPITRE 1
REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Introduction

Depuis de cent ans, l'homme essaie tant bien que mal de déchiffrer comment notre système immunitaire se défend contre les microorganismes pathogènes. Avec les années, plusieurs grandes découvertes ont permis d'améliorer nos connaissances en la matière.

Ce n'est qu'après la découverte de George D. Snell, le père du complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH, que l'immunologie à proprement dite s'est développée considérablement [1,2]. En effet, Snell a pu observer que chez les animaux génétiquement identiques des tumeurs peuvent être greffés avec succès d'un animal à l'autre. Ainsi, grâce à ses travaux de transplantation de tumeurs chez des souris congéniques, Snell a réussi à mettre en évidence des marqueurs à la surface des cellules qui intervenaient dans le rejet de greffe. Ces marqueurs ou structures seront appelés molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le CMH est composé d'un groupe de gènes dont plusieurs produits jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance des antigènes (Ag) par les lymphocytes T.

Les cellules de l'immunité peuvent se classer en deux grands groupes; les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et les lymphocytes. Les CPA internalisent l'antigène et le présente aux lymphocytes. Ces derniers reconnaissent l'antigène grâce à des récepteurs membranaires spécifiques.

La réaction immunitaire est mise en jeu par la pénétration d'agents pathogènes qui suscitent un remue-ménage du système immunitaire permettant à celui-ci d'éliminer les microorganismes étrangers. Ces pathogènes seront ingérés par les cellules présentatrices d'antigène, plus précisément les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques. Les CPA vont à leur tour modifier le pathogène pour le présenter aux lymphocytes T CD4⁺ associé à leurs molécules de classe II du CMH (Figure 1.1). Ainsi, grâce à sa machinerie moléculaire, la CPA pourra dégrader les antigènes en peptides et les charger à la surface de ses molécules de CMH de classe II. L'activation des lymphocytes T CD4⁺ par les molécules de classe II déclenche une réponse immunitaire spécifique. Il y aura à ce moment sécrétion de cytokines qui stimuleront la production d'anticorps par les cellules B et activeront les cellules T cytotoxiques CD8⁺ et les macrophages. Aujourd'hui, la structure biochimique et moléculaire des acteurs du système immunitaire est un aspect important dans la recherche de la guérison et la prévention des maladies infectieuses.

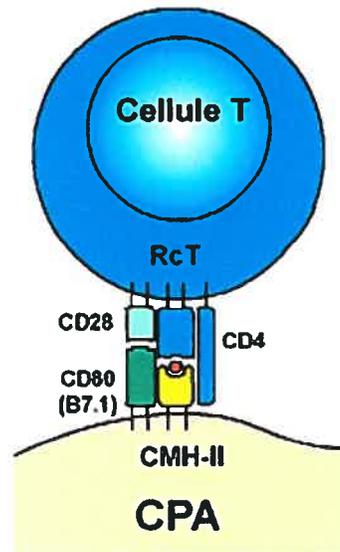


Figure 1.1 La présentation antigénique aux lymphocytes T.

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) internalisent l'antigène, le dégrade et l'associe à leurs molécules classiques de classe II pour le présenter à leur surface. La stimulation des cellules T $CD4^+$ par les CPA, nécessite l'interaction entre le récepteur des cellules T (RcT) et son co-récepteur, le CD4 avec le complexe CMH-II / peptide. Au même instant, il y a aussi présentation du récepteur CD80 (B7.1) qui sera reconnu par le CD28 des cellules T.

(Adapté de Immunobiologie 5, Janeway et *al*, 2001)

1.2 Les molécules du CMH de classe II

La reconnaissance entre le soi du non-soi par le système immunitaire est probablement la fonction essentielle du CMH. En effet, l'extrême diversité des produits des gènes du CMH et le caractère unique de la combinaison des antigènes de HLA expliquent les variations de la réponse immunitaire d'un individu à l'autre. La fonction des molécules du CMH de classe II est de présenter les peptides antigéniques aux récepteurs des cellules T (RcT) en association avec le CD4. Contrairement aux molécules du CMH de classe I, qui sont exprimées chez la plupart des cellules nucléées, les CMH de classe II sont limitées spécifiquement aux cellules immunitaires spécialisées, plus précisément les cellules présentatrices d'antigènes. Toutefois, à la suite d'un traitement à l'IFN- γ , la majorité des cellules du système immunitaire peuvent exprimer les molécules de classe II [3].

1.2.1 Locus du CMH de classe II

Chez l'homme, les gènes qui codent pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, sont aussi appelés HLA pour « *Human Leukocyte Antigen* ». En effet, historiquement, c'est d'abord à la surface des globules blancs que ces antigènes ont été identifiés. Les gènes qui codent pour les antigènes HLA sont situés sur le chromosome 6 (Figure 1.2). Cette région du génome, appelée HLA ou complexe majeur d'histocompatibilité, s'étend sur 4000 kb et renferme un nombre considérable de gènes les plus polymorphes du génome humain.

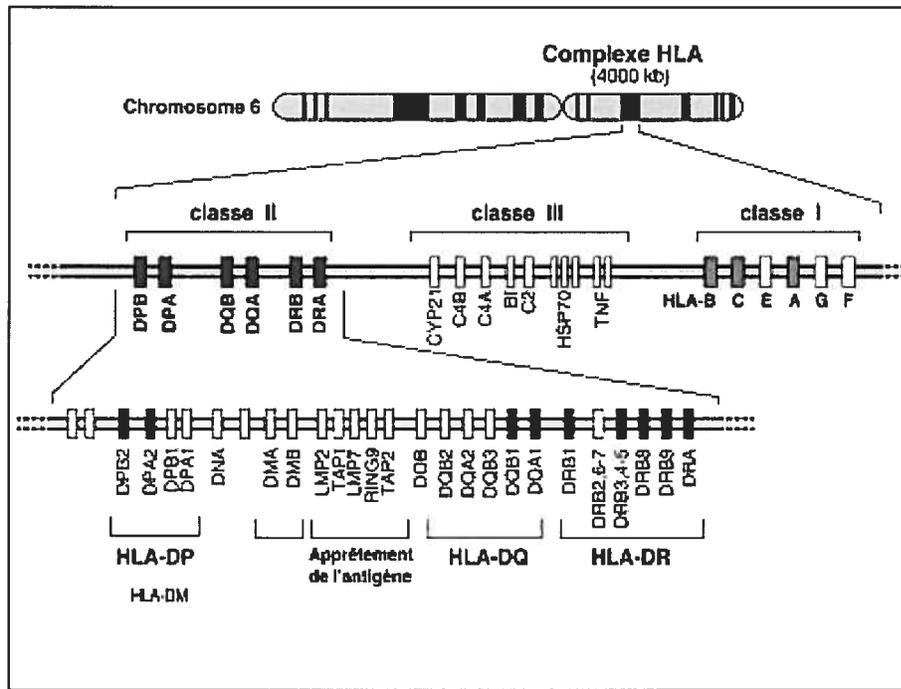


Figure 1.2 Région du complexe majeur d'histocompatibilité humain. Situé sur le bras court du chromosome 6 (région 6p 21.3), le complexe HLA est un ensemble de gènes qui codent pour les antigènes du CMH. La diversité des gènes HLA est impressionnante. En effet, suite au séquençage on a pu mettre à jour environ 1500 allèles HLA [4,5].

(Adapté de <http://www.icampus.ucl.ac.be/.../04-07-HLA/compl-HLA.htm>)

Ce locus contient tout d'abord trois différents isotypes de molécules CMH-II classiques : HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR. Il comprend également les gènes qui codent pour les HLA de classe I : HLA-A, HLA-B et HLA-C, ainsi que des gènes pour des molécules apparentées : HLA-E, HLA-G et HLA-F. Certains gènes codent pour d'autres molécules de HLA, telles que HLA-DM et HLA-DO, des molécules du CMH de classe II dites non-classiques. Enfin, on retrouve dans ce locus une série de gènes dont le produit joue un rôle dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T. C'est le cas de LMP2 et LMP7 qui correspondent à des composantes du protéasome [6-8] ou encore de TAP1 et TAP2 qui transportent des fragments peptidiques dans le réticulum endoplasmique [9]. L'expression des gènes du CMH de classe II est sous le contrôle du transactivateur CIITA (*class II transactivator*) [10]. Cependant, CIITA est un coactivateur qui interagit avec certains facteurs plutôt qu'avec l'ADN directement [11]. Par exemple, le facteur de transcription RFX5 est essentiel à l'expression constitutive des gènes du CMH de classe II [12,13]. Une mutation dans le gène de RFX5 provoque un syndrome de déficience en molécule CMH-II ou BLS pour « *Bare Lymphocyte Syndrome* ». Cette maladie est caractérisée par une absence d'expression des molécules de CMH-II [14]. Ce défaut d'expression des molécules de CMH-II cause des infections à répétition et les personnes qui en sont atteintes ont une espérance de vie de moins 20 ans.

1.2.2 La structure des molécules classiques de CMH de classe II

Les molécules du CMH de classe II classiques sont des glycoprotéines transmembranaires de type I comprenant une région N-terminale localisée dans la partie extracellulaire et une portion C-terminale intracellulaire. C'est en 1993 que le groupe de Wiley a publié pour la première fois la structure cristalline de la molécule HLA-DR1 [15]. Les molécules de classe II sont des hétérodimères associant de manière non covalente une chaîne alpha de 31-34 kDa à une chaîne bêta de 26-29 kDa [16,17]. Ces deux chaînes possèdent quatre domaines extracellulaires, $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$, $\beta 2$ suivis de parties transmembranaires et intracytoplasmiques très courtes (Figure 1.3).

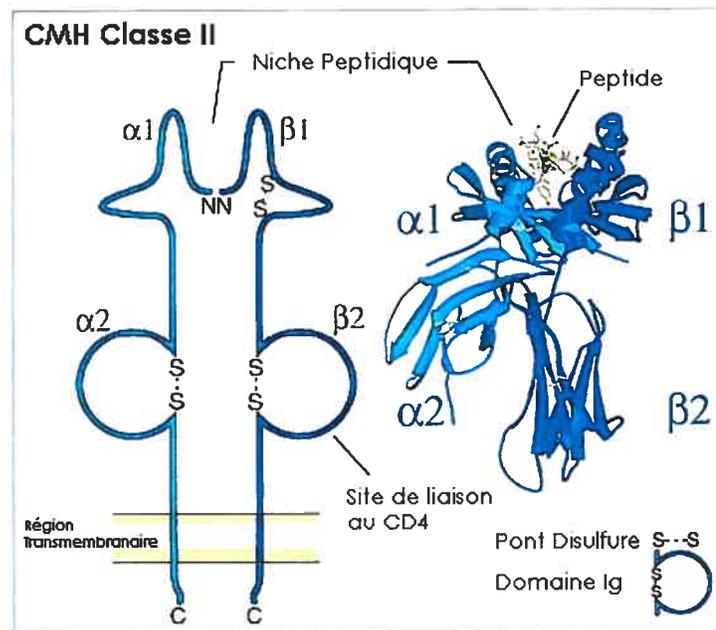


Figure 1.3 Structure de la molécule du CMH de classe II.

Les molécules du CMH sont composées de 4 domaines. Les régions $\alpha 1$ et $\beta 1$ composent la niche peptidique tandis que les portions $\alpha 2$ et $\beta 2$ correspondent aux domaines de la famille des immunoglobulines. (Adapté de Immunobiologie 5, Janeway et al, 2001)

Le récepteur CD4 des lymphocytes T interagit principalement avec le domaine $\beta 2$ des molécules de classe II [18]. Les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$ se replient de façon conventionnelle à celle des protéines de la famille des immunoglobulines [19]. Toutefois, il n'en est pas de même pour les domaines les plus distaux, $\alpha 1$ et $\beta 1$. Ces domaines adoptent une conformation spatiale tout à fait caractéristique aux molécules du CMH de classe II classiques, leur conférant une capacité de présenter un antigène. Ce site de liaison peptidique est constitué d'une niche de 8 feuilletts antiparallèles encadrés de deux hélices α [15], formant ainsi une niche de 25 Å de long par 10 Å de large (Figure 1.4). Les deux extrémités de la fente sont ouvertes permettant alors la présentation de peptides antigéniques d'une longueur variant entre 13 à 24 acides aminés, dépassant largement les deux extrémités de la niche [20]. Le très grand polymorphisme des allèles HLA s'exprime essentiellement au niveau du site de fixation peptidique attribuant ainsi à chaque allèle une certaine spécificité à l'égard des millions de peptides issus de la dégradation protéinique. Les peptides emprisonnés dans une molécule de CMH de classe II classique présentent une homogénéité pour certaines positions que l'on appelle points d'ancrages. Au total, on estime que chaque molécule de CMH-II qui ne peut lier qu'un seul peptide à la fois, présente un potentiel de liaison pour environ quelques milliers de peptides différents. Du fait de ce tri intracellulaire, fonction des allèles hérités, on voit que le système immunitaire n'a qu'une vue très partielle du soi. Il n'est tolérant qu'aux quelques milliers de peptides qui lui sont présentés en permanence par les allèles hérités des deux parents.

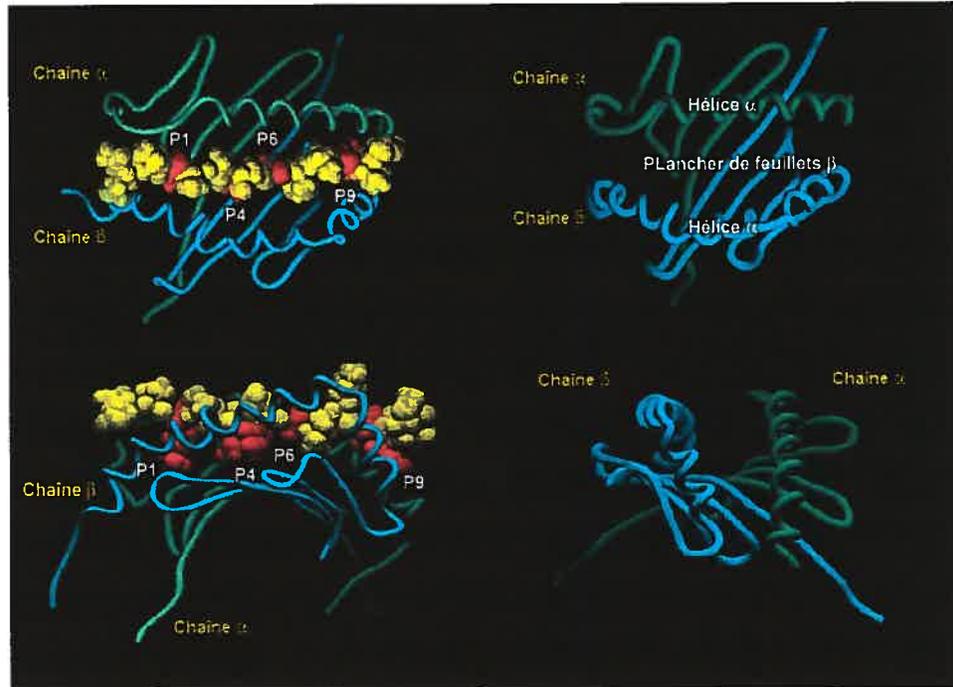


Figure 1.4 Structure de la niche peptidique des molécules du CMH-II. Le sillon peptidique est formé d'hélices alpha et de feuillets bêta où se fixe le peptide par des sites spécifiques ou poches polymorphiques (P1, P4, P6 et P9). Les panneaux de droite représentent la niche vide tandis que ceux de gauche montrent la niche occupée par un peptide. (Adapté de <http://depts.washington.edu/rhwlab/dq/3structure.html>)

1.3 La présentation antigénique

La raison d'être des molécules du CMH de classe II classiques est de signaler aux lymphocytes T CD4⁺ la présence de pathogènes dans l'organisme [21-23]. L'activation des cellules T auxiliaires CD4⁺ est un évènement crucial dans l'induction d'une réponse immunitaire. Contrairement aux cellules B qui lient directement l'antigène, les cellules T ne reconnaissent l'antigène qu'en association avec les molécules du CMH exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène. En effet, l'antigène n'est pas reconnu sous sa forme native, mais uniquement après avoir subi des transformations physicochimiques [23]. C'est sous cette forme modifiée que le peptide antigénique ancré dans la niche peptidique des molécules du CMH-II qu'il sera reconnu par le récepteur des cellules T CD4⁺ [24].

Les molécules du CMH de classe II classiques sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) où elles s'associent rapidement en proportion stoechiométrique avec des trimères de la chaîne invariante (Ii) (un dimère $\alpha\beta$ pour une molécule Ii), formant ainsi des nonamères qui seront exportés vers les endosomes via l'appareil de Golgi [25-29]. La chaîne invariante est une glycoprotéine membranaire de type II d'environ 220 résidus dont la région C-terminale est luminale et la portion N-terminale est intracellulaire (Figure 1.5). Celle-ci peut être produite sous quatre isoformes différentes. En effet, la présence de deux codons d'initiation et un épissage alternatif produit des formes variables de la chaîne invariante. Toutefois, chez l'homme, la forme p33 prédomine comparativement aux autres isoformes qui sont, p35, p41 et p43.

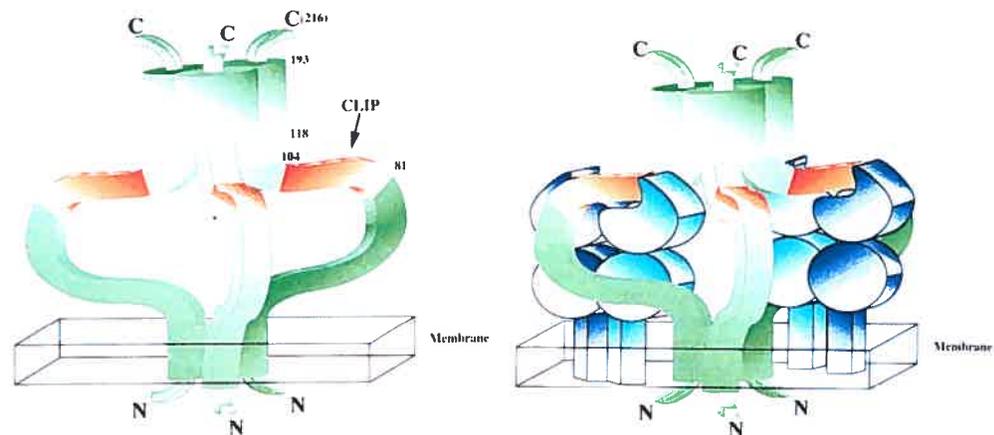


Figure 1.5 Structure du trimère et nonamère de Ii et du CMH-II.

Le panneau de gauche montre les chaînes invariantes trimérisées de couleurs vertes et une partie orange correspondant au CLIP. Tandis que celui de droite présente l'association entre les chaînes Ii et les CMH-II de couleurs bleu et violet (pour alléger la figure une des molécules du CMH-II a été retirée)(Adapté de Cresswell, P. *Cell* 1996) [29].

La chaîne invariante joue un rôle important dans la présentation antigénique par les molécules de CMH-II. En effet, elle permet le repliement adéquat des molécules de classe II néosynthétisées dans le RE en les stabilisant. En son absence, la majorité des molécules s'agrègent dans le RE et ne sont pas transportées vers l'appareil de Golgi [30,31]. Par conséquent, la chaîne Ii facilite le transport des molécules de classe II du RE à l'appareil de Golgi et finalement vers les endosomes, grâce à des signaux d'adressage localisés dans la région cytoplasmique de la chaîne Ii [32-34]. Enfin, la chaîne invariante joue le rôle de chaperon en empêchant le chargement précoce de peptides endogènes dans la niche des molécules de classe II [24,35]. Au niveau des endosomes, la chaîne Ii est progressivement dégradée à partir de son extrémité C-terminale par des protéases auxquelles résistent les

molécules de classe II [36,37]. Différentes endoprotéases de la famille des cathepsines sont impliquées dans la dégradation de la chaîne invariante. Il s'agit plus particulièrement de la cathepsine S et L dans les cellules présentatrices de l'antigène [38-42]. Ces deux protéases à cystéines sont indispensables à la dégradation de la chaîne invariante. L'inhibition [40] ou l'absence [38,41] de la cathepsine S empêche la protéolyse de Ii et conduit à une accumulation à la membrane plasmique de complexes formés de molécules de CMH-II et de fragments de Ii d'environ 10 kDa. Il en résulte par une diminution de la présentation de l'antigène par les molécules de CMH-II [43]. À la suite de la dégradation de la chaîne invariante par les cathepsines, un fragment peptidique de 20 à 24 acides aminés correspondant à la région 81-104, appelé peptide CLIP (pour « *class II associated invariant chain peptide* ») [35], reste temporairement associé aux dimères $\alpha\beta$ des molécules de classe II. La structure cristalline de CLIP associé à la molécule HLA-DR3 a révélé que celui-ci se fixe au niveau du sillon peptidique de façon quasiment identique aux peptides antigéniques [44]. Enfin, cette association temporaire de la chaîne invariante aux molécules de classe II a pour fonction d'empêcher le chargement de peptides endogènes jusqu'à des compartiments spéciaux, appelés MIIC (pour « *MHC class II compartment* »). C'est Peters et al. en 1991 qui ont été les premiers à observer des molécules de CMH de classe II dans ces compartiments multilamellaires ressemblant aux lysosomes et présents dans toutes les cellules présentatrices d'antigènes [45,46]. Donc, suite à l'arrivée des molécules de classe II associées au CLIP dans les MIIC, il y aura dissociation du complexe. Une molécule non-classique, HLA-DM (DM) est responsable de cette dissociation. En effet, son activité catalytique favorise la libération de la niche peptidique pour remplacer le CLIP par un peptide antigénique. On remarque aussi que l'affinité plus ou moins grande de la chaîne invariante pour les différents

allèles des molécules de classe II facilite cette séparation [47]. Ainsi, l'association de peptides antigéniques aux molécules de classe II s'effectue dans les compartiments MIIC, différents des endosomes précoces, tardifs ou lysosomaux, auxquels toutefois, les antigènes internalisés par endocytose auraient accès [48].

Les antigènes exogènes sont captés dans le milieu extracellulaire et transportés au sein de la cellule par un processus d'endocytose. La substance à ingérer (protéine, microorganisme ou débris cellulaire) est incluse dans une invagination de la membrane plasmique qui se détache pour former une vésicule intracellulaire, appelée endosome (Figure 1.6). La voie endocytique est composée d'une suite de vésicules, caractérisées par une acidité croissante et contenant une grande variété d'enzymes protéolytiques impliqués dans la dégradation de l'antigène [49]. On distingue schématiquement, les endosomes précoces (pH 6,0-6,5), les endosomes tardifs (pH 5,0-6,0) et les lysosomes (pH 4,5-5,0). Les endosomes précoces représentent les compartiments où les molécules à recycler vers la membrane plasmique sont séparées de celles qui sont transportées vers les compartiments tardifs. Les endosomes et plus particulièrement les MIIC sont des compartiments cellulaires importants pour le chargement de peptides sur les molécules de CMH-II [49-51]. En effet, c'est dans leur environnement protéolytique et acide que les protéines antigéniques internalisées par endocytose sont dénaturées et dégradées en peptides. À la suite de l'élimination du peptide CLIP, le sillon de liaison des molécules de CMH-II est comblé par un peptide antigénique provenant du MIIC. Chaque molécule du CMH ayant chargée efficacement un peptide antigénique quitte le compartiment MIIC. Ces complexes seront transportés vers la membrane plasmique par un mécanisme

d'exocytose pour être reconnu finalement par les récepteurs des lymphocytes T CD4⁺.

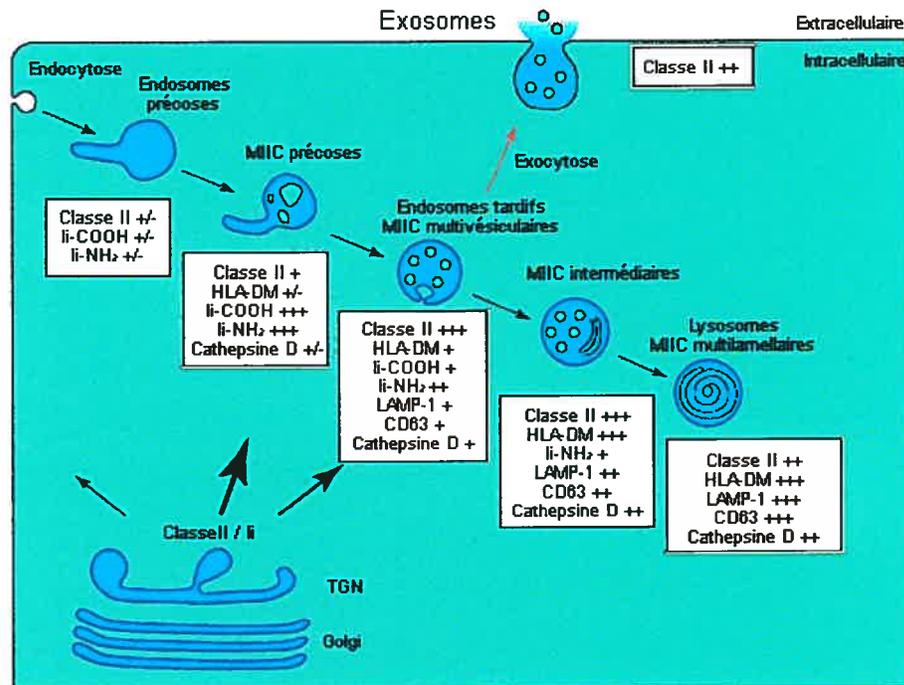


Figure 1.6 Voie endosomale des molécules du CMH de classe II.

La voie endosomale est composée d'une série de vésicules caractérisées par une acidité croissante où transitent les molécules de classe II. Synthétisées dans le réticulum endoplasmique, les molécules de classe II passe au travers l'appareil de Golgi et le réseau transgolgien (TGN) pour parvenir aux compartiments endosomaux. La majorité des molécules quittent le TGN pour aller directement soit aux compartiments MIIC précoces soit aux endosomes tardifs ou MIIC multivésiculaires. Finalement les complexes CMH-II/peptide sont alors dirigés vers la membrane plasmique où ils seront présentés aux lymphocytes CD4⁺. (*LAMP-1 = lysosome-associated membrane protein*). (Adapté de Geuze, H.J. *Immunol Today* 1998) [52].

1.4 La molécule HLA-DM

1.4.1 Structure et expression de la molécule HLA-DM

La molécule HLA-DM (H2-M chez la souris) a une structure très proche de celle des molécules de CMH-II classiques [53,54]. Tout comme les CMH-II classiques, HLA-DM est composée d'une chaîne α de 33-35 kDa et d'une chaîne β de 30-31 kDa qui s'assemblent dans le RE, formant une molécule hétérodimérique [55]. Par contre ces molécules sont dites non-classiques car elles sont très peu polymorphiques et elles ne sont pas exprimées à la surface des cellules [56,57]. Leur distribution cellulaire est la même que pour les CMH-II classiques. Toutefois, les molécules HLA-DM s'accumulent dans des compartiments intracellulaires endocytiques [57]. Cette accumulation est due à un motif de ciblage (YTPL) contenu dans la queue cytoplasmique de la chaîne β [58-60]. La mutation d'un des résidus du motif et plus particulièrement les résidus tyrosine et leucine provoquent une accumulation de la molécule à la surface des cellules. La transcription des gènes de DMA et DMB est sous le contrôle des facteurs CIITA et RFX-5 et l'INF- γ en augmente l'expression [61-63].

1.4.2 Fonctions de la molécule HLA-DM

On a tout d'abord cru que DM pouvait lier des peptides dus aux ressemblances structurales avec les molécules classiques de classe II. Cependant, des études de liaison peptidique ont démontrées que des molécules purifiées de HLA-DM ne peuvent pas lier de peptides de façon stable [64]. Toutefois, les incertitudes concernant la possibilité de liaison peptidique de HLA-DM ont finalement été résolues grâce aux structures cristallines de DM et H2-M [53,54]. Ces structures en trois dimensions ont confirmé qu'il était impossible pour la molécule DM de

lier un peptide car sa niche peptidique est considérablement restreinte comparativement aux molécules classiques (Figure 1.7). Par contre, HLA-DM est primordiale pour la présentation antigénique de classe II [65]. Plusieurs rôles lui sont attribués et l'on pourra voir plus en détails chacun d'eux dans les prochaines lignes.

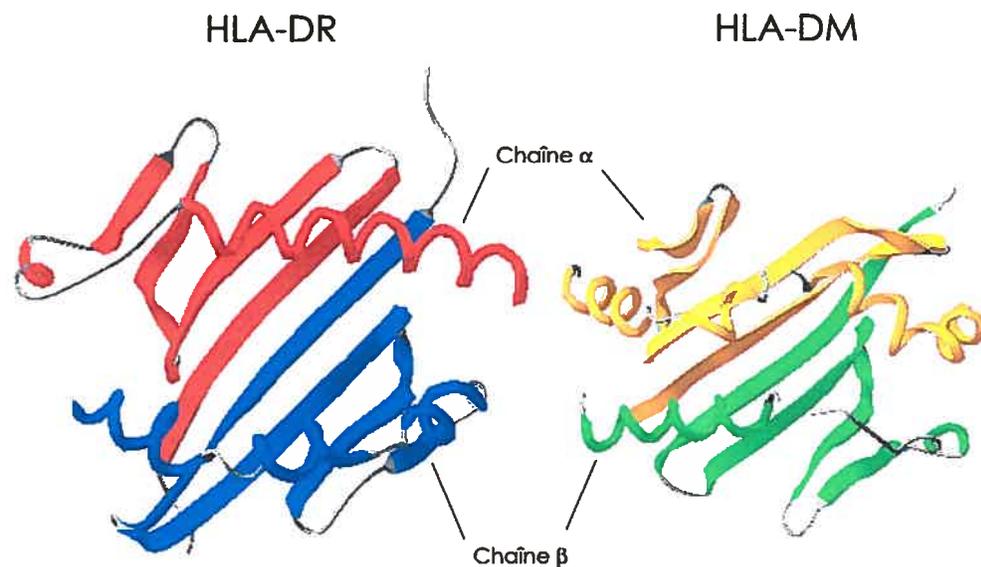


Figure 1.7 Comparaison des niches peptidiques des molécules HLA-DR et HLA-DM. Le panneau de gauche montre la niche peptidique de la molécule de CMH de classe II classique (HLA-DR) démontrant bien que le sillon est d'une largeur suffisante pour accueillir un peptide antigénique. Le panneau de droite montre la molécule non-classique HLA-DM, qui ne présente pas de niche peptidique mais contient un petite poche centrale chargée négativement dont la fonction est inconnue [66].

(Les structures en 3D des molécules de HLA-DR (1T5W) et de HLA-DM (1HDM) sont tirées de Protein Data Bank et visualisées avec DeepView/Swiss-PdbViewer v3.7)

Des études réalisées au niveau des cellules B ayant une délétion soit d'une chaîne ou des deux chaînes de la molécule DM ont démontré qu'il y avait une augmentation de 50% des niveaux de CLIP à la surface cellulaire [67,68]. La molécule HLA-DM contrôle la relâche de CLIP et favorise ainsi le chargement de peptide antigénique dans la niche des molécules de classe II classiques (Figure 1.8) [69-72]. L'efficacité de la molécule DM est semblable à celle d'une enzyme. En effet, l'échange peptidique catalysé par DM est de l'ordre de 3 à 12 DR-CLIP par minute [73]. De plus, les peptides ayant une faible affinité pour les molécules de CMH-II classiques seront dissociés par DM favorisant ainsi la présentation de peptides à forte affinité [74]. On remarque aussi que l'activité de HLA-DM est optimale dans un environnement acide (pH 4.5) correspondant au pH des vésicules tardives ou MIIC, où sont générés les peptides antigéniques [75]. A ce pH, les molécules de CMH-II non chargées sont particulièrement instables et se comportent comme des protéines non repliées, ce qui les rend non fonctionnelles et susceptibles à la dégradation [76]. Des données indiquent que HLA-DM agit comme un chaperon pour les molécules de classe II classiques en les protégeant de la dénaturation dans les compartiments acides et en maintenant leur habileté à lier des peptides antigéniques [76,77].

Finalement, certaines études ont tenté de mieux caractériser l'association entre la molécule non-classique HLA-DM et la molécule classique HLA-DR. Par des mutations sur la chaîne β de la molécule DM, le groupe de Mellins a démontré que l'interaction entre DM et DR se produisait du côté latéral de DR via des régions hydrophobiques [78]. Ces résultats concordent avec des études ultérieures montrant qu'il y a une perte d'interaction entre les deux molécules lorsqu'on effectue des mutations du côté latéral de HLA-DR tout près de la région N-terminale [71,79,80]. Plus récemment, le groupe de Neefjes a aussi montré par un

système *in vivo* dans des cellules HEK293, qu'il était possible de suivre l'interaction entre DM et DR lorsque celles-ci sont couplées à des fluorochromes [81].

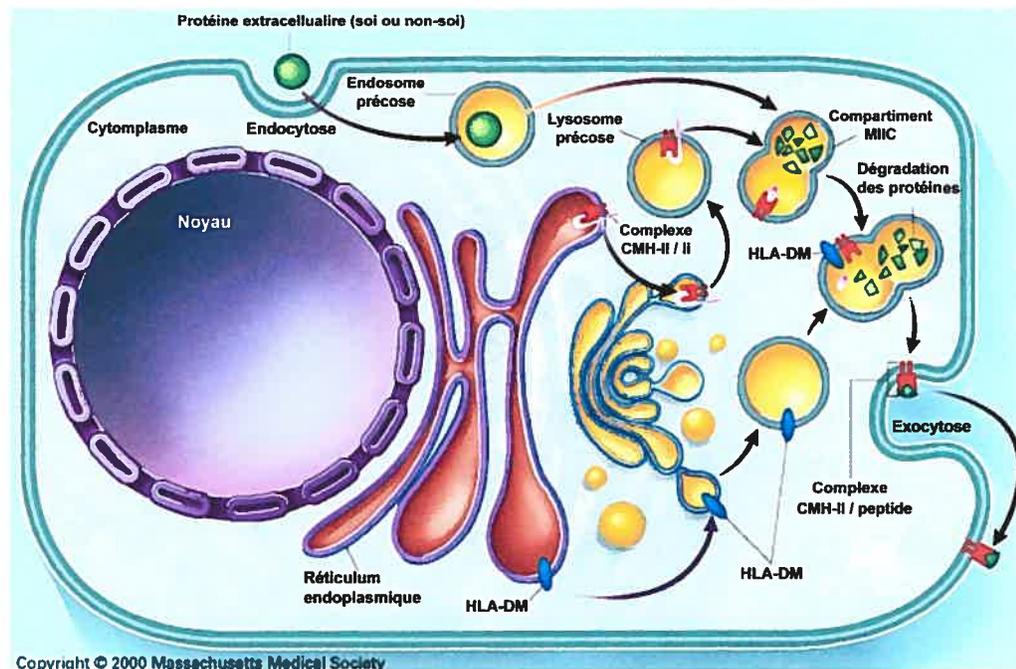


Figure 1.8 La voie de la présentation antigénique des molécules du CMH de classe II. Les molécules du CMH de classe II sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique où elles s'associent à la chaîne invariante pour son transport vers les compartiments endosomaux. Au niveau des compartiments MIIC, la chaîne Ii est dégradée et seul le peptide CLIP reste dans la niche peptidique des molécules de CMH-II. C'est à ce moment qu'entre en jeu la molécule HLA-DM. En effet, celle-ci catalyse l'échange de CLIP pour un peptide issu de la dégradation d'une protéine extracellulaire du soi ou du non-soi. Finalement, ce complexe CMH-II / peptide sera présenté à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes.

(Adapté de Klein, J. & Sato, A. *N. Engl. J. Med.* 2000) [82].

1.5 La molécule HLA-DO

1.5.1 Structure et expression de la molécule HLA-DO

Comme les molécules de classe II classiques, la molécule HLA-DO (H2-O chez la souris) est une protéine hétérodimérique formée d'une chaîne α de 32-34 kDa et d'une chaîne β de 33-34 kDa. C'est dans les années 80 que deux nouveaux gènes codant pour une protéine semblable aux molécules classiques ont été découverts par hybridation croisée. Ces gènes ont été nommés respectivement DZ et DOB [83-85]. La chaîne DZ a été par la suite rebaptisée DN α pour finalement devenir DO α . Cependant, l'association entre la chaîne α et la chaîne β n'a été révélée qu'après des travaux chez la souris par le groupe de Karlsson en 1991 [86]. Ces résultats avaient amené l'hypothèse, qui a été confirmée par la suite, que les gènes DNA et DOB chez l'homme pouvaient se lier pour former une molécule, aujourd'hui connue sous le nom de HLA-DO [87].

La régulation de la transcription du gène DOA est sous le contrôle du transactivateur CIITA. Tout comme les autres gènes de classe II, celui-ci est inductible par INF- γ . Toutefois, son niveau d'expression est moindre que pour les molécules classiques [85]. Il en est tout autrement pour la chaîne β , car son gène n'est pas inductible par l'INF- γ et son expression est indépendante du CIITA [84,88].

Ainsi, après leur synthèse dans le réticulum endoplasmique, les chaînes α et β s'assemblent pour former une molécule hétérodimérique. Cependant, il a été démontré que cette dimérisation s'avère insuffisante pour permettre la sortie de la molécule du RE lorsque les deux chaînes sont exprimées dans des cellules HeLa [89]. Le groupe de Karlsson a établi que la molécule DO était fortement associée à DM lors du

transport intracellulaire dans les cellules B. En effet, dans les lymphocytes B des souris n'exprimant pas H2-M, on remarque une diminution de l'expression des molécules H2-O ainsi qu'une rétention au RE [90,91]. Par ailleurs, suite à l'association avec HLA-DM, les complexes DM-DO sont guidés vers les compartiments endosomaux grâce à un motif d'adressage de type tyrosine contenu dans la queue cytoplasmique de DM [92,93]. Néanmoins, HLA-DO possède elle aussi un motif de ciblage dans la queue de la chaîne β . Par contre, la mutation de ce motif n'empêche pas les complexes DM-DO de ce diriger vers les compartiments endosomaux [92].

Tout comme HLA-DM, HLA-DO est classée dans les molécules non-classiques, tout d'abord parce qu'elle n'est pas exprimée à la surface des cellules (donc incapable de présenter des peptides) [64], et parce qu'elle est très peu polymorphique [94-96]. Par contre, sa distribution cellulaire diffère de celle de DM. En effet, DO est principalement exprimée dans les lymphocytes B et dans les cellules épithéliales thymiques [86,87]. L'expression de HLA-DO dans l'épithélium thymique suggère que la molécule pourrait influencer la sélection des thymocytes. Toutefois aucune étude n'a adressé cette hypothèse.

Finalement, à ce jour, il n'existe encore aucun cristal qui pourrait nous révéler la structure exacte de DO. À cet effet, très peu on réussi à produire la molécule HLA-DO sous sa forme soluble [91]. Nous verrons donc plus loin les explications à ce sujet.

1.5.2 Fonctions de la molécule HLA-DO

La molécule HLA-DO a un rôle particulier à jouer dans la présentation antigénique. Tout d'abord, l'alignement des séquences en acides aminés des gènes DOA et DOB démontre un niveau de conservation élevé chez les mammifères [97,98]. Par ailleurs, on retrouve une séquence de sept acides aminés (VWRLPEF) du gène DOA très bien conservée parmi les carnivores [99]. Ensuite l'expression des dimères $\alpha\beta$ est restreinte à certaines cellules présentatrices d'antigène telles que les lymphocytes B et les cellules épithéliales thymique [86,87]. Finalement, son association obligatoire avec la molécule DM pour transiter dans les compartiments endosomaux lui confère un rôle distinct dans la présentation antigénique [89].

L'instabilité de la molécule DO et sa dégradation précoce en absence de DM expliquent pourquoi à ce jour il est difficile de produire la molécule sous forme soluble dans le but d'obtenir sa structure tridimensionnel. Ayant besoin de DM pour son transport intracellulaire, DO se trouve donc constamment associée à DM. De ce fait, il fût facile de prévoir que DO aurait un rôle de régulation sur HLA-DM. En effet, on note une accumulation de CLIP dans la niche peptidique des molécules classiques à la surface des lignées cellulaires sur-exprimant la molécule DO. Ces résultats suggèrent fortement que la molécule HLA-DO est un important modulateur de l'apprêtement peptidique [100]. Cependant, on peut remarquer dans la littérature que plusieurs publications sont en conflit concernant la fonction moléculaire exacte de DO. Ainsi, plusieurs groupes ont réalisés des tests fonctionnels *in vitro*, utilisant des préparations soit de DM soit de complexes DM-DO [91,100-102]. La conclusion globale de ses recherches confirme que la molécule HLA-DO a un rôle régulateur sur DM et que celui-ci inhibe la fonction catalytique de HLA-DM sur les molécules classiques en augmentant

ainsi la proportion du CLIP dans la niche peptidique. En effet, le chargement de peptides sur les molécules classiques est diminué par les complexes DM-DO. Toutefois personne n'a pu déterminer une inhibition absolue de DM par DO [91,100-102]. On a pu remarquer aussi qu'aucun effet est attribuable par la molécule DO seule sur la présentation antigénique [91,101]. Bien qu'il y ait plusieurs publications en faveur d'un rôle négatif de HLA-DO sur la molécule DM certains prétendent le contraire. C'est le cas entre autre du groupe de Moldenhauer qui affirme que l'expression de la molécule DO au niveau de mélanocytes aurait une répercussion plutôt positive sur le chargement de peptides de haute affinité [101]. Ainsi, DO posséderait un rôle de co-chaperon vis-à-vis DM et contrôlerait la qualité des peptides présentés à la surface des cellules.

Ces différences pourraient provenir du fait que l'activité de DO dépend du pH environnant. Ceci suggère qu'il y a une localisation intracellulaire précise pour le chargement de peptide. En effet, la répression de l'activité de DM s'observe à des pH variant de 5.5 et 6.5, pH que l'on retrouve dans les endosomes précoces. Ce n'est qu'à des pH plus acides et au niveau des lysosomes ou des endosomes tardifs que la molécule DM peut enlever CLIP en présence de DO [91,101,103,104]. De plus, une étude réalisée sur des souris ayant une délétion du gène DOA a pu démontrer qu'il y avait une augmentation de la présentation de peptides de faibles affinités internalisés par pinocytose (phase fluide) en absence de DO [91]. En effet, DO favoriserait la présentation d'antigènes internalisés par fixation aux immunoglobulines membranaires (mIg) ou récepteurs des cellules B (RcB). Ces résultats apportent l'hypothèse que HLA-DO ferait la discrimination de certains peptides par la façon dont ceux-ci sont internalisés. En effet, une étude par le groupe de Karlsson, démontre

que la présentation de différents épitopes se trouve à être augmentée, diminuée ou non affectée en absence de H2-O selon la spécificité des mlg utilisées pour l'internalisation de l'antigène [105]. Ce qui est intéressant, c'est que les épitopes d'un même Ag n'ont pas nécessairement la même dépendance vis-à-vis H2-O. En effet, ceci suggère que H2-O pourrait contrôler le répertoire peptidique des cellules B selon l'interaction entre le R_cB et l'antigène. Par ailleurs, il semble que le fond génétique à son importance, car le rôle de H2-O varie en fonction de celui-ci [106].

En résumé, l'apprêtement de l'antigène dans le système de présentation antigénique de classe II est bien connu. DM joue un rôle essentiel dans ce processus, rôle qui n'est pas seulement d'enlever le CLIP des molécules classiques mais aussi d'éditer le répertoire des peptides. Malheureusement il est impossible de prédire quels peptides vont être présentés. Contrairement à la molécule DM, la fonction de DO n'est pas totalement élucidée. Pour mieux comprendre son implication dans la présentation antigénique, il faudrait également en savoir plus sur le fonctionnement général de chacun des compartiments endosomaux et lysosomaux dans la présentation antigénique.

Pour terminer, une étude toute récente publiée par notre laboratoire démontre qu'il est possible d'obtenir une molécule DO ayant une conformation stable en absence de DM [107]. En effet, l'identification d'un site de liaison de DM c'est avéré important pour stabiliser DO et ainsi aider dans la maturation de la molécule. Suite à l'alignement des séquences des molécules de HLA-DQ α et de HLA-DO α , on a remarqué une forte similitude entre ces deux chaînes au niveau de leur structure primaire. De plus à l'aide de la structure cristalline de la molécule I-A (homologue de HLA-DQ chez l'humain) on

a pu distinguer qu'un résidu glycine en position 9 de la chaîne α , formait une protubérance vers la chaîne β au niveau du plancher de la niche peptidique [108]. Ce renflement maintiendrait l'arrangement des résidus de chacune des chaînes impliquées dans les contacts inter-chaînes. Cependant, dans la chaîne $DO\alpha$, cette glycine en position 10 est suivie d'une proline qui pourrait perturber le feuillet β et empêcher le résidu $\alpha10$ de produire une protubérance et de ce fait troubler l'alignement précis des feuillets anti-parallèles. C'est ainsi qu'en créant une mutation dans la région $\alpha1$ de la molécule $DO\alpha$ on a pu rétablir le repliement adéquat de la molécule. En effet, c'est la mutation d'une proline pour une valine en position 11 de la chaîne α ($\alpha P11V$) qui stabilise la molécule (Figure 1.9).

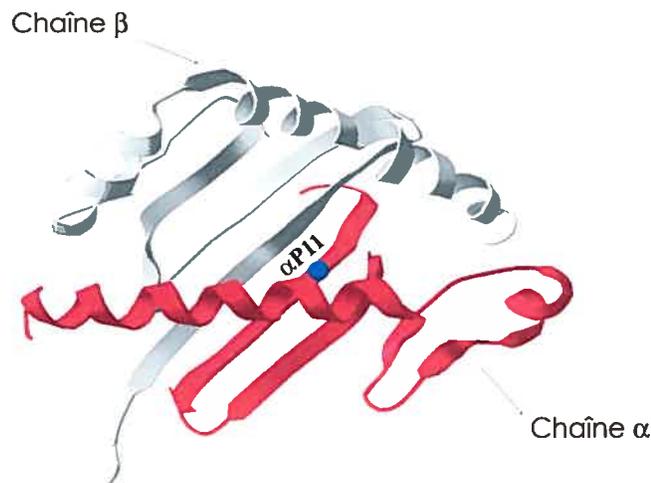


Figure 1.9 Représentation de la mutation $\alpha P11V$.

La mutation $\alpha P11V$ est responsable de la maturation et de la stabilité de HLA-DO en absence de DM. Celle-ci est désignée par un point bleu sous un fond génétique de HLA-DQ.

(Adapté de Deshaies, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005) [107]

Tout d'abord, des analyses biochimiques et de microscopie à fluorescence ont démontrées une résistance à l'endoglycosidase H (EndoH) ainsi qu'une colocalisation avec le CD63 (un marqueur d'endosomes tardifs), confirmant la maturation des molécules DOP-V. De plus, des tests fonctionnels utilisant des cellules HeLa CIITA⁺ exprimant soit HLA-DO α P11V soit HLA-DO sauvage ont démontré qu'il y avait un niveau comparable de CLIP dans la niche peptique des molécules de classe II classiques [100,102]. Finalement, cette mutation permet l'expression, de la molécule DO à la surface tant au niveau des cellules HEK 293T qu'au niveau des cellules HeLa. Ces travaux laissent entrevoir la possibilité d'utiliser un tel mutant afin de générer des formes solubles de HLA-DO.

1.6 Molécules solubles

Grâce à un système d'expression dans des cellules d'insectes, il est possible de produire sous forme sécrétée une protéine soluble. En effet la quantité et la qualité de production de ce système sont telles que l'on peut utiliser les protéines recombinantes pour des analyses fonctionnelles ou pour obtenir la structure cristalline d'une protéine [109-112].

Plusieurs groupes de recherche ont exploité cette avenue pour produire différentes protéines. C'est le cas par exemple du groupe de Khandekar qui a utilisé les cellules d'insectes pour produire un récepteur membranaire, le CD23, présent à la surface des cellules B et des monocytes chez des personnes atteintes de leucémie lymphatique chronique [113]. Un autre groupe de recherche a aussi employé le système d'insectes pour produire un enzyme, BACE (pour « *beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme* ») [114]. Cette enzyme clive

le précurseur de la protéine amyloïde, composante principale des plaques que l'on retrouve dans les cerveaux des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer. Ces deux exemples démontrent à quel point ce système de production de protéines solubles peut servir dans plusieurs domaines et à diverses applications. En effet, les cellules d'insectes sont exploitées depuis de nombreuses années pour produire des molécules solubles du complexe majeur d'histocompatibilité [115-123].

Ainsi, bien avant de connaître la structure tridimensionnelle de DM, des molécules HLA-DM solubles produites en cellules d'insectes furent utilisées afin de définir leurs fonctions biologiques [71]. En effet, le groupe de Mellins a purifié des molécules recombinantes de HLA-DM provenant de surnageant de cellules d'insectes transfectées. Ils ont ainsi pu démontrer l'importance de la molécule DM sur le chargement de peptide antigénique dans la niche des molécules DR. Suite à cela, parallèlement, les groupe de Wiley et Kappler ont utilisés des procédés similaires de production de molécules solubles pour cristalliser les molécules DM et H2-M, respectivement [53,54]. Finalement, c'est le groupe de Peterson en 1992 qui a le mieux caractérisé l'expression de molécules solubles du CMH chez les cellules de drosophile [116]. En effet, ils ont produit la molécule H-2E dans des cellules de drosophile à l'aide d'un vecteur d'expression à haut rendement obtenant ainsi une concentration supérieure à 4 mg/L de molécules recombinantes. Pour bien comprendre l'impact de l'efficacité des cellules de drosophile, il faut savoir qu'en 1987 le groupe de Wiley avait obtenu 4 mg de molécules en produisant plus de 200 L de culture de cellules de mammifère pour cristalliser HLA-A2 [124]. Ces résultats démontrent à quel point on obtient une qualité et une quantité considérable de molécules solubles par les cellules d'insectes.

La production de molécules solubles peut aussi se faire à l'aide d'infection au baculovirus. On peut obtenir des concentrations pouvant aller jusqu'à 500 mg/L en utilisant ce système [125]. Toutefois, ce virus se réplique seulement dans un type de cellules d'insectes, les Sf9 (lepidopteran) et peut provoquer la destruction de celles-ci lors de cycle lytique, diminuant ainsi la production de protéine [126]. Néanmoins, une étude utilisant un nouveau système d'infection au baculovirus, le système baculovirus-S2, a démontré que chez les cellules de drosophiles on observe aucune lyse cellulaire après l'infection [127]. Ce type de système peut être une alternative à des transfections peu efficaces à la lipofectamine ou par précipitation au phosphate de calcium [128,129].

Enfin, pour produire une molécule soluble, on doit utiliser un vecteur d'expression spécifique aux cellules d'insectes *Drosophila melanogaster* S2 [130]. De plus, on doit retranche les domaines transmembranaires et cytoplasmiques pour obtenir une version soluble de la molécule. Ensuite, on insère la portion de l'ADNc de la molécule codant le domaine extracellulaire suivi d'une séquence de purification comportant un épitope de six résidus histidine. Une telle séquence permet à la protéine recombinante d'acquérir de l'affinité pour les métaux divalents tels que le Ni^{+2} et de pouvoir être purifiée par chromatographie d'affinité. En amont de la séquence codante on retrouve le promoteur du gène métallothioneine assurant un haut niveau d'expression suite à une induction au sulfate de cuivre (CuSO_4) [131]. Et finalement, en aval, on trouve la séquence poly-A assurant la maturation de l'ARM messenger. Un dernier point important à mentionner concerne la culture elle-même des cellules de drosophiles. En effet, la culture des cellules se fait à une température près de la température ambiante (22-27°C) sans ajout supplémentaire de CO_2 ce qui représente un autre

avantage comparativement aux autres types de cellules. Comme il a été démontré, le système d'expression chez les cellules de drosophiles présente de nombreux d'avantages.

1.7 Les anticorps monoclonaux

Le système immunitaire dit « adaptatif » agit par l'intermédiaire de deux principaux mécanismes qui sont la réponse de type humoral (production d'anticorps) et la réponse à médiation cellulaire. Les immunogènes sont les molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique. Il s'agit généralement de substances étrangères tels que des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides ou des acides nucléiques. L'efficacité du système immunitaire des mammifères repose sur un très grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les lymphocytes B se caractérisent par la présence à leur surface de récepteurs spécifiques de type immunoglobuline. Ce sont ces cellules qui assurent la réponse à médiation humorale. Les anticorps sont sécrétés par des plasmocytes provenant de la différenciation des lymphocytes B à la suite d'une stimulation antigénique. Chaque anticorps peut reconnaître par sa portion variable de ses chaînes lourdes et légères un épitope ou déterminant antigénique composé habituellement de cinq ou six acides aminés (Figure 1.10).

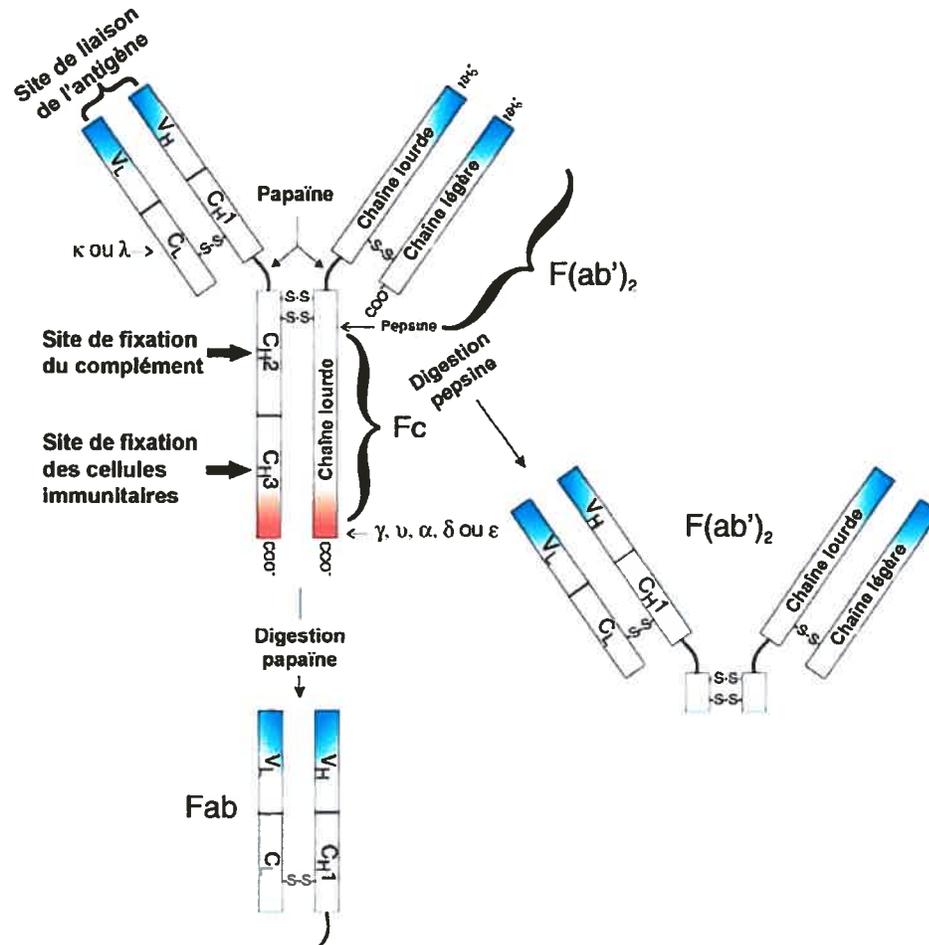


Figure 1.10 Structure générale d'une immunoglobuline. Les immunoglobulines (Ig) sont constituées de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes lourdes (chaînes H) et de deux chaînes légères (chaînes L). Il existe cinq types de chaînes lourdes, gamma (γ), mu (μ), alpha (α), delta (δ) et epsilon (ϵ) et deux types de chaînes légères, kappa (κ) et lambda (λ). Des enzymes protéolytiques, la papaïne et la pepsine, brisent les chaînes polypeptidiques à des endroits spécifiques produisant soit deux Fab (pour *fragment antigen-binding*) soit un F(ab')₂. La fixation de l'antigène se situe au niveau des parties variables des chaînes lourdes (V_H) et des chaînes légères (V_L). (Adapté de <http://probes.invitrogen.com/handbook/boxes/0439.html>).

La reconnaissance des antigènes par les anticorps est bien caractérisée [132] de même que le cristal du complexe antigène-anticorps a été déterminé par le groupe *Amit et al* en utilisant un lysozyme comme antigène et le fragment Fab de l'anticorps [133]. Le répertoire des anticorps produits par le système immunitaire en réponse à un antigène est dit polyclonal. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs clones différents de cellules B ayant subi une recombinaison somatique propre à chacun. Ainsi les anticorps sont une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps sont hétérogènes dans leur spécificité, leurs isotypes, leur titre et leur affinité pour leur épitope. Étant donné la diversité des anticorps sécrétés dans la réponse polyclonale, il est difficile d'obtenir deux antisérums polyclonaux identiques lorsque l'on immunise deux souris différentes avec le même antigène. Ainsi, la quantité d'anticorps produite et leur qualité varient d'un animal à l'autre et même chez le même animal à des moments différents. La découverte de technologies telles que la technique d'anticorps monoclonaux (AcM) a révolutionnée le monde des anticorps. En effet, comparativement aux anticorps polyclonaux plusieurs avantages caractérisent les AcM. Les anticorps monoclonaux sont issus d'un même clone et sont donc spécifiques à un même épitope pour lequel ils ont une affinité déterminée. Ainsi, si l'on obtient l'AcM souhaité, celui-ci pourra être extrêmement spécifique pour l'immunogène visé et, dans des conditions appropriées, on pourra créer un produit de qualité constante en quantité presque illimitée. Les anticorps monoclonaux sont des anticorps qui ont une seule spécificité choisie et qui sont habituellement sécrétés de façon continue par des hybridomes rendus immortels.

Le principe de base des hybridomes est de réunir en une seule cellule d'une part l'aptitude à produire un anticorps d'une spécificité donnée et d'autre part la capacité de proliférer à l'infini de façon à aboutir à une production massive de cet anticorps. La fusion entre un lymphocyte B apportant la spécificité et une cellule de myélome en prolifération permanente permet la production massive de molécules d'anticorps toutes identiques c'est-à-dire monoclonales (Figure 1.11).

La technique des hybridomes a été mise au point par Georges J.F. Köhler et César Milstein et leur a valu le prix Nobel de médecine en 1984. Cet outil a eu des répercussions considérables sur les méthodes diagnostiques et les thérapies ainsi que sur l'ensemble de la recherche biomédicale. C'est en 1975 que Köhler et Milstein produisent pour la première fois un hybridome qui sécrète des AcM anti-GRM (globules rouges de mouton). Pour cela, ils mélangèrent *in vitro* des splénocytes de souris anti-GRM avec une lignée de myélome de souris et réalisèrent la fusion entre ces deux cellules grâce à une préparation de virus Sendai inactivés [134]. Ils venaient donc de concevoir un outil fabuleux qui allait apporter énormément, tant sur le plan de la recherche fondamentale que sur le plan de la médecine clinique. Pour saisir l'importance de ce nouvel outil, il faut comprendre qu'avant la mise au point de la technique des hybridomes, on ne pouvait obtenir que des mélanges d'anticorps pratiquement impossibles à purifier.

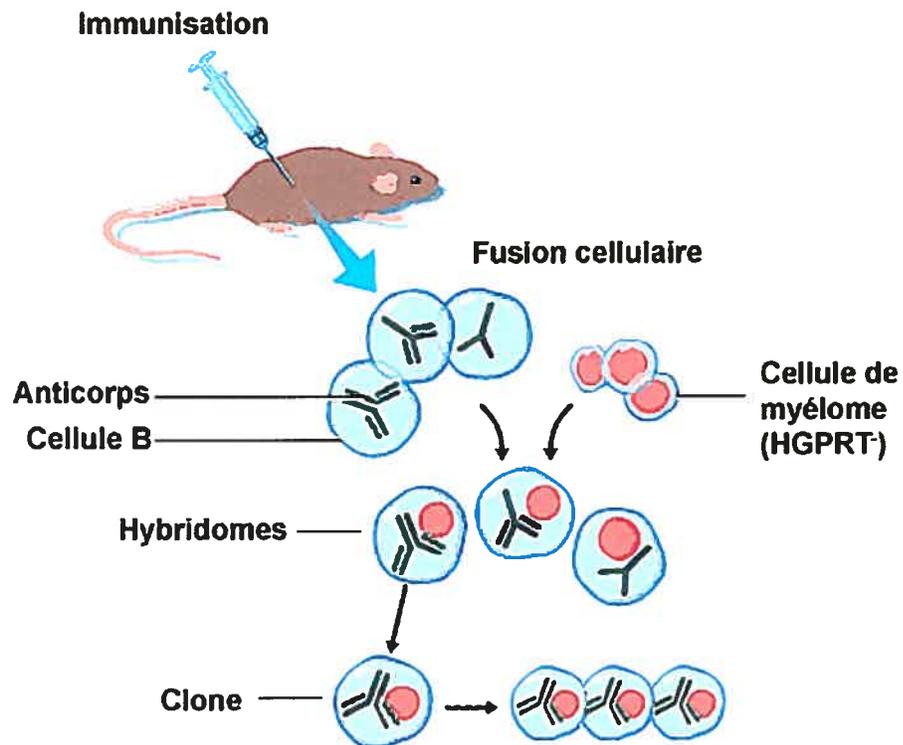


Figure 1.11 Technique d'obtention d'un hybridome producteur d'anticorps monoclonal. Après l'immunisation d'une souris contre un antigène, la rate est prélevée. Puis, on fusionne les cellules B contenues dans la rate avec les cellules de myélome (HGPRT) à l'aide de polyéthylène glycol (PEG). Les hybridomes sont cultivés en milieu HAT qui élimine les cellules non fusionnées. Les cellules hybrides sont ensuite clonées pour obtenir un hybridome synthétisant un anticorps monoclonal spécifique à l'antigène injecté à la souris. (Adapté de http://encarta.msn.com/.../Producing_Monoclonal_Antibodies.html)

Par rapport à la technique initiale, des améliorations ont été apportées en introduisant comme facteur de fusion du polyéthylène glycol ou PEG (30 à 50%) ou un courant électrique (électrofusion) au lieu du virus Sendai inactivé. De plus, la fusion peut s'effectuer entre une cellule de myélome et un lymphocyte provenant de ganglions lymphatiques. En effet, une étude récente publiée en 2003 par Basalp et Yucel affirme obtenir des concentrations plus élevées en anticorps lorsque la fusion utilise des cellules ganglionnaires [135]. Suite à la fusion cellulaire, une première sélection s'impose afin de pouvoir isoler les cellules hybrides. Tout d'abord, l'élimination des cellules spléniques se fait d'elle-même. En effet, ces cellules ne se divisent pas indéfiniment, et meurent rapidement au bout de 24 à 48 heures. Pour éliminer les cellules immortelles non hybrides, on utilise une lignée myélomateuse déficiente en enzymes thymidine-kinase (TK) ou hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase (HGPRT). Ces enzymes sont nécessaires à la synthèse de l'ADN par la voie exogène habituellement utilisée. Dans une cellule normale, la synthèse d'ADN se fait soit par la voie exogène à partir de l'hypoxanthine et de la thymidine, soit par la voie endogène de sauvegarde qui fait appel aux acides aminées (A.A.) et aux sucres (Figure 1.12). Si l'on bloque la voie de sauvegarde en introduisant de l'aminoptérine dans le milieu, les cellules myélomateuses non hybrides mourront n'ayant pas recours à la voie exogène. Ainsi, il ne subsistera que les hybridomes utilisant la voie de sauvegarde qui leur est accessible grâce aux chromosomes provenant des lymphocytes B normaux. Donc, après la fusion, on ajoute une solution HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine) dans le milieu de croissance. Dans ce milieu sélectif, seul les cellules hybrides survivent grâce à l'hypoxanthine et à la thymidine fournies par le milieu HAT.

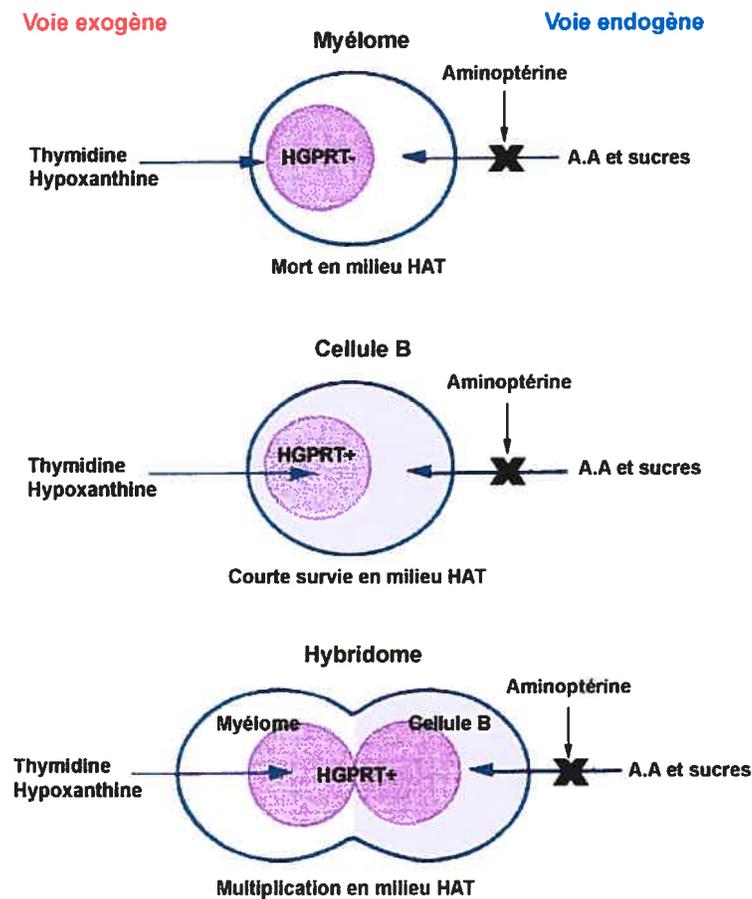


Figure 1.12 Sélection des hybridomes en milieu HAT. Pour séparer les cellules du myélome de celles ayant fusionné, on introduit de l'aminoptérine dans le milieu. Ainsi, on bloque la voie endogène ou de sauvegarde nécessaire à la synthèse de l'ADN. Étant dépourvues d'enzyme (HGPRT), les cellules myélomateuses sont incapables de synthétiser de l'ADN par la voie exogène habituelle. Les lymphocytes B non fusionnés n'auront qu'une courte durée de vie, car ces cellules meurent d'elles-mêmes après quelques jours. (Adapté de <http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/immuno/LePoly/AnneVI.html>)

Après avoir sélectionné les hybridomes dans le milieu HAT, on sépare les cellules par dilution limite. Pour cela, on isole des cellules individuelles par dilution, dans des puits d'une plaque de microtitration, de façon à obtenir des populations cellulaires provenant d'une seule cellule hybride. Les anticorps produits par chaque clone sont alors dits « monoclonaux ». Ces cellules sont cultivées et on récupère le surnageant contenant les anticorps afin de tester leur capacité à reconnaître l'antigène original. Les clones positifs sont mis en culture et on pourra produire les anticorps monoclonaux en grande quantité dans un milieu de culture ou bien dans une souris via une ascite. La technique de production d'ascites fait appel au développement d'une tumeur liquide du péritoine suite à l'injection d'hybridomes [136]. On prélève par la suite le liquide ascitique contenant les AcM [137]. Généralement, on obtient un volume entre 1-2 ml pour une souris et une concentration d'AcM variant entre 1 et 28 mg/ml [138,139]. Malgré la popularité de cette technique, celle-ci présente plusieurs désavantages [140]. Tout d'abord, il faut veiller à une compatibilité du système H-2 entre les hybridomes et la souris ou alors utiliser des souris SCID (syndrome d'immunodéficience sévère combinée) ou nues (*nude*). Les souris nues constituent une lignée de souris qui génétiquement ne possèdent ni thymus, ni poils. Le plus intéressant avec ces types de souris, c'est qu'elles sont incapable de produire un rejet immunitaire, de plus elles produisent moins d'anticorps murins non spécifiques avec un rendement équivalent d'AcM spécifiques [141]. Par contre, elles doivent être élevées dans des conditions d'isolement particulier pour éviter leur mort par des agents infectieux pathogènes. Ensuite, un autre désavantage provient du fait qu'il peut y avoir des contaminations d'immunoglobulines provenant de l'animal hôte. Et finalement, des restrictions liées à l'éthique ont amené les chercheurs à trouver de nouvelles méthodes de production [142]. Aujourd'hui, des

alternatives réduisent ou éliminent l'utilisation d'animaux de laboratoire. Tout d'abord, on peut obtenir jusqu'à 20 mg/ml d'anticorps en utilisant un minifermuteur [137,143]. Mais, encore une fois, cette technique comporte quelques désavantages non négligeables. En effet, dû à la complexité de la technique, aux risques de contaminations aux mycoplasmes et aux coûts relatifs aux investissements initiaux, elle est plutôt restreinte aux industries qu'aux laboratoires de recherche [144]. Finalement, l'utilisation d'un système de flacon de culture à 2 chambres s'avère être le meilleur choix (Figure 1.13) [140,145]. Ainsi, on peut obtenir entre 1-5 mg/ml d'anticorps comparativement à la méthode de culture conventionnelle en flacon qui elle est plutôt d'environ 0.1 mg/ml [140,145].

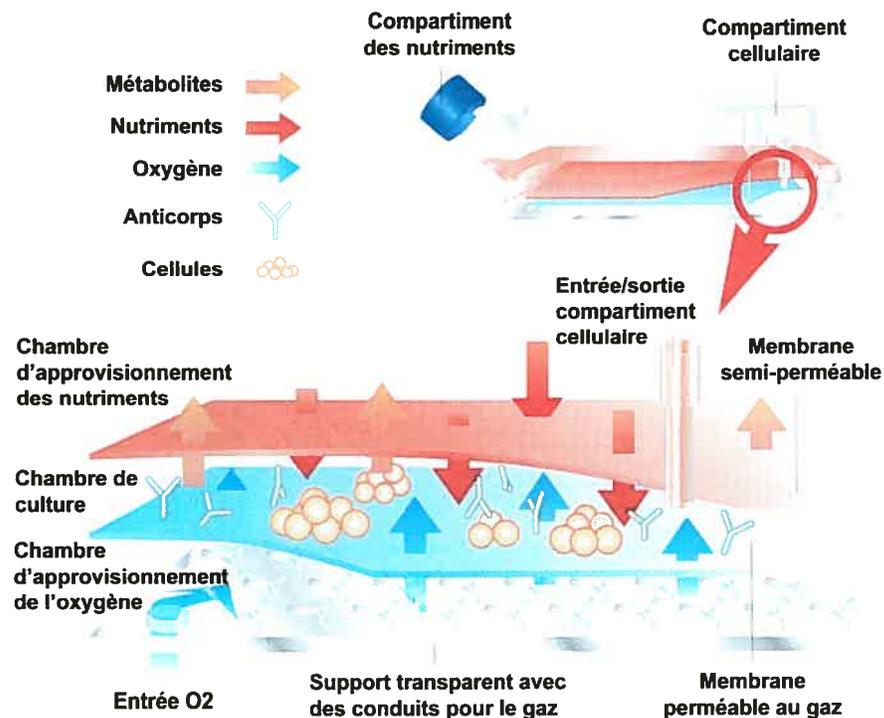


Figure 1.13 Production d'anticorps dans un flacon à 2 compartiments. Tout d'abord, les cellules sont introduites dans le flacon par le compartiment cellulaire (... millions de cellules dans 20 ml de milieu de culture) ou elles sont emprisonnées dans une membrane semi-perméable. Ensuite, le milieu de culture est ajouté par le compartiment des nutriments. Ainsi, les anticorps produits par ces cellules sont retenus dans un petit compartiment cellulaire (chambre de culture) où les nutriments provenant d'un second compartiment (chambre d'approvisionnement des nutriments) passent au travers une membrane semi-perméable. De plus, l'apport d'oxygène et de CO₂ aux cellules est possible grâce à une membrane perméable au gaz à diffusion rapide contenu au fond du flacon.

(Adapté de http://www.bdbiosciences.com/.../celline_quick.pdf)

Finalement, voici un survol des inconvénients et des limites de la technique de production d'anticorps monoclonaux. Tout d'abord, l'étape la plus limitante représente sans conteste celle de la fusion cellulaire. Quoique favorisée par le PEG, il existe d'autres procédés de fusion cellulaire tels que l'électrofusion qui dépolarise brièvement les membranes cellulaires. Deux autres aspects sont également limitants dans cette technique. La stabilité en culture des hybrides obtenus et la capacité des animaux à s'immuniser contre un antigène donné. Une bonne immunisation devra tenir compte de la forme, la quantité et de la voie d'administration de l'antigène ainsi que de l'utilisation d'adjuvant et du choix de l'animal [146]. L'immunisation se fait principalement chez la souris ou chez le rat et certaines lignées répondent mieux que d'autres. On peut rendre un antigène plus immunogène en le couplant à des protéines porteuses telles que de l'albumine sérique ou BSA (*Bovine Serum Albumine*), de l'ovalbumine, ou du KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Par contre, souvent si l'immunogène n'est pas assez antigénique, la protéine porteuse peut entrer en compétition avec celui-ci. En effet, il y aura développement d'une réaction immunitaire dirigée seulement vers la protéine porteuse au lieu de l'antigène désiré [147]. L'utilisation d'adjuvant peut aussi stimuler la réponse immunitaire. Leur emploi permet d'accroître et de prolonger la production d'anticorps. L'ajout d'adjuvant lors de l'immunisation est habituellement nécessaire lorsqu'on ne dispose que de peu d'antigènes ou lorsque la production d'anticorps est faible [148]. L'adjuvant généralement utilisé est celui de Freund [149]. Il s'agit d'une émulsion d'eau dans l'huile constituée d'huile minérale et de monooléate de mannide [150]. Cela a pour effet de retarder la diffusion de l'antigène et d'augmenter ainsi la durée de contact avec le système immunitaire. On parlera d'adjuvant complet de Freund (ACF) lorsqu'il y a présence de mycobactéries *Mycobacterium tuberculosis* tuées par chaleur. Les mycobactéries attirent les

macrophages et d'autres cellules immunitaires au site d'injection et amplifient ainsi la réponse immunitaire [148]. Toutefois, il faut savoir que l'ACF peut réagir fortement sur l'organisme de l'animal. En effet, l'huile minérale ne peut être métabolisée et les mycobactéries peuvent provoquer des réactions granulomateuses intenses [148]. Il est à noter qu'une concentration de mycobactéries en dessous de 0,1 mg/ml provoque moins de réactions inflammatoires [151]. L'injection est faite sous-cutanée en préparant au préalable le mélange adjuvant-antigène. On vortex l'adjuvant en y ajoutant un volume égale d'antigène pour former une émulsion. Néanmoins cette première injection n'est pas suffisante pour augmenter significativement le taux d'anticorps et il faut réaliser plusieurs rappels. Par contre, comme l'ACF induit une forte réponse immunitaire, il est déconseillé de l'utiliser pour les immunisations subséquentes [146]. En effet, une stimulation trop forte peut conduire à la mort de l'animal. À ce moment, il est préférable d'utiliser soit l'antigène seul soit l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) qui lui ne contient pas de mycobactéries. Malgré la venue d'autres adjuvants, l'ACF reste l'adjuvant de choix pour induire efficacement une réponse spécifique à l'antigène [152].

En résumé les avantages de la technique développée par Köhler et Milstein sont 1) que chaque hybridome produit un seul type d'anticorps issu de recombinaisons génomiques qui ont eu lieu au cours du développement du lymphocyte B correspondant et 2) les anticorps monoclonaux fixent quasi-exclusivement la molécule cible réduisant considérablement les risques de réactions croisées. On obtient ainsi des résultats d'analyses plus fiables comparativement aux anticorps polyclonaux. De plus, la pureté des anticorps produits par ces cellules hybrides permet de réaliser des études cristallographiques et génétiques. En théorie, ces cellules peuvent produire indéfiniment leurs

anticorps. Les cellules productrices peuvent être conservées aisément dans l'azote liquide et remises en culture au besoin.

1.8 Objectifs et hypothèses de travail

Jusqu'à maintenant, aucunes études n'ont réussi à élucider complètement le rôle de HLA-DO dans la présentation antigénique. C'est pourquoi il s'avère intéressant de développer des outils pour mieux caractériser cette molécule. Par exemple, générer un anticorps monoclonal spécifique à HLA-DO. En effet, il existe très peu d'anticorps monoclonal reconnaissant la molécule DO et tous sont dirigés contre la chaîne β . En effet, comme la molécule est instable seule on doit injecter les complexes DM-DO pour produire un anticorps. Notre laboratoire a démontré que DM se liait du côté latéral de la chaîne α de la molécule DO. Ceci expliquerait pourquoi les anticorps produits à l'aide de complexe DM-DO sont tous dirigés vers la chaîne β . L'utilisation de la mutation α P11V confère à DO un repliement adéquat. Ainsi, notre hypothèse est que nous pensons qu'avec cette molécule stable, on favoriserait l'obtention d'un anticorps dirigé contre la chaîne α . Ce type d'anticorps pourrait répondre à plusieurs questionnements. Tout d'abord, en comparant les séquences primaires des chaînes α des molécules classiques de classe II et de la molécule DO, on remarque qu'il y a beaucoup de similitudes. Ainsi, on pourrait vérifier avec un anticorps dirigé contre la chaîne α de DO si certains défauts de présentation pourraient être dus à un mauvais appariement entre une chaîne α de la molécule DO et une chaîne β d'une molécule classique de classe II. De plus, il serait intéressant d'utiliser cet anticorps pour mieux caractériser les cellules dendritiques qui elles n'expriment pas de HLA-DO mature, mais seulement la chaîne α . Pour réaliser nos

objectifs, nous avons produit des molécules solubles du CMH de classe II non-classiques, HLA-DO. Ainsi, suite à l'élimination des portions transmembranaires et cytoplasmiques de la molécule recombinante, HLA-DO α P11V, nous avons utilisé un système d'expression chez les cellules de drosophiles pour obtenir des concentrations élevées de la molécule soluble. Et finalement, nous avons utilisé ces molécules pour immuniser des souris dans le but d'obtenir un hybridome produisant un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule HLA-DO.

CHAPITRE 2

ARTICLE

**Production of soluble HLA-DO and an specific
light chain dimeric monoclonal antibody**

Nathalie Bédard* and Jacques Thibodeau*

* Laboratoire d'Immunologie Moléculaire,
Département de Microbiologie et Immunologie,
Faculté de Médecine,
Université de Montréal, Canada

Keywords: HLA-DO, soluble molecules, light chain dimer, *Drosophila melanogaster*

2.1 SUMMARY

Contrary to other antigen presenting cells (APC), B cells express a non-classical MHC class II molecule, HLA-DO (DO), which is implicated in the modulation of antigen presentation. This molecule inhibits the activity of HLA-DM (DM) and thus decreases the presentation of exogenous peptides by the classical MHC class II molecules. We have employed *Drosophila melanogaster* Schneider S2 cells and an inducible expression vector to produce on a large scale secreted soluble HLA-DO molecules on a large scale. To express folded DO in the absence of DM, the DO α chain was mutated at position α P11V. DOP11V molecule presents a conformation and stability similar to the wild-type HLA-DO when associated with HLA-DM. The α chain was histidine-tagged and DO was purified by affinity chromatography. Yields of 1 mg/L were obtained. Soluble DOP11V was injected into mice and a monoclonal antibody (NBDO) was produced and characterized. These results demonstrate the usefulness of the DOP11V mutant for the molecular characterization of HLA-DO.

2.2 RÉSUMÉ

Contrairement aux autres cellules présentatrices de l'antigène (CPA), les cellules B expriment une molécule de CMH II non-classique, HLA-DO (DO) impliquée dans la modulation de la présentation antigénique. Cette molécule inhibe l'activité de HLA-DM (DM) et diminue ainsi la présentation de peptides exogènes par les molécules classiques de classe II. Nous avons utilisé des cellules *Drosophila melanogaster* Schneider S2 et un vecteur d'expression inducible pour produire de grandes quantités sécrétées de la molécule HLA-DO. Toutefois, pour exprimer la molécule DO en absence de DM, la chaîne DO α a subi une mutation en position α P11V. Cette molécule présente une conformation et une stabilité semblables à DO sauvage lorsque cette dernière est associée à DM. La chaîne α contient un épitope histidines servant à la purification des molécules DO par chromatographie d'affinité. Des rendements de 1 mg/L ont été obtenus. DOP11V soluble a été injecté à des souris et un anticorps monoclonal a été obtenu (NBDO). Ces résultats ont démontré l'utilité du mutant DOP11V pour la caractérisation moléculaire de HLA-DO.

2.3 INTRODUCTION

Antigen presentation via the classical major histocompatibility complex (MHC) class II molecules is essential for the activation of CD4⁺ T cells and antibody production. The $\alpha\beta$ heterodimeric class II molecules are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) where they associate with the invariant chain (Ii) to form nonameric $(\alpha\beta Ii)_3$ complexes. After this association, the complexes are exported in specialized intracellular compartments, called MIIC (MHC class II compartments) via the Golgi complex [1-5]. There, the Ii is gradually degraded by proteases leaving the class II peptide binding groove occupied by a remnant peptide, CLIP (for class II associated invariant chain peptide) [6-9]. In these specialized compartments, the exchange of CLIP for an antigenic peptide is catalyzed by a non-classical MHC class II molecule, HLA-DM (DM; H2-M in the mouse) [10]. Experiments with mice lacking functional H2-M show a reduction of antigen presentation by the MHC class II molecules [11-13].

In B lymphocytes, HLA-DM function is modulated by yet another non-classical MHC II molecule HLA-DO [14-17]. HLA-DO (DO; H2-O in mouse), is expressed mostly in B cells and in the thymic epithelium [18]. Like classical MHC class II molecules, DO is a heterodimer formed by two chains, DO α and DO β [19-21]. After synthesis in the ER, DO usually strongly associates with DM [22]. This association is essential for DO's conformational stability preventing its premature aggregation and degradation [11,16,22], and allowing its successful egress from the ER [22]. Indeed, both transmembrane and truncated soluble forms of DO are unstable and only minor amounts exit the ER in absence of DM [16,22]. Recently, we described a new mutation in the HLA-DO α chain (P11V) allowing the HLA-DO heterodimer to recover a stable

conformation without HLA-DM's help. This acquired stability allows the mutant DO (DOP-V) to exit the ER without undergoing degradation [23]. Further biochemical analysis showed an acquired endoglycosidase H (EndoH) resistance of the mutant heterodimer confirming its exit from the ER through the Golgi. For it is in the Golgi that the simple EndoH sensitive ER oligosaccharides are modified to form more complex sugars. Moreover, DOP-V, as well as wild type (wt) DO, retained the ability to inhibit CLIP exchange by HLA-DM resulting in an accumulation of MHC II-CLIP complexes at the surface when expressed in CIITA transfected HeLa cells. Finally, DOP-V could be expressed at the surface of cells, contrary to the wtDO that is limited to intracellular expression [16,22].

Here, we report that *Drosophila* S2 cells can be used to produce correctly assembled soluble HLA-DO. The purified molecule was used to immunize mice and generate B cell hybridomas. Then, DOP-V expressing HeLa cells were used to screen the positive hybridomas. We also show that DOP11V can be used to produce correctly assembled $\alpha\beta$ heterodimers from *Drosophila* S2 cells.

2.4 MATERIALS AND METHODS

2.4.1 Antibodies

The following monoclonal antibodies were used: Mags.DO5 recognizes a conformational determinant of DO [24]; M2 is specific for the FLAG epitope tag (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) and anti-His₆ specifically recognizes an epitope of six consecutive histidine residues (Roche Diagnostics, Laval, QC). As secondary antibody, the Alexa Fluor 488-conjugated® goat anti-mouse IgG (H + L) (Molecular Probes, Eugene, OR) was used.

2.4.2 Plasmids

The pCoHygro vector was obtained from Dr. R. Sékaly (University of Montreal). pRmHA-3DO α (containing the (His)₆ tag) and pRmHA-3DO β (containing the FLAG epitope tag) were provided by Dr. E. Mellins (Stanford University). pRmHA-3DO α P11V was generated by inserting the fragment containing the mutation DO α P11V. First, the pBudDO α P11V [23] was digested with *Pst*I and the fragment was cloned in *Pst*I site of pBlueScript vector (Stratagen, Austin, Texas). After, the pBSDO α P11V was digested with *Aat*II-*Eco*RI and the fragment was finally cloned into the *Aat*II-*Eco*RI sites of pRmHA-3DO α to generate pRmHA-3DO α P11V. All constructs were confirmed by sequencing.

2.4.3 Cell lines

Schneider-2 (S2) *Drosophila melanogaster* cells (a gift from Dr. R. Sékaly) [25] were cultured in Drosophila SFM (Invitrogen, San Diego, CA) containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine and antibiotic-antimycotic

(Wisent Inc, St-Bruno, QC). Mouse myeloma cells P3X63Ag8.653 (ATCC: CRL-1580) were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS (Wisent). HeLa and HeLa DOP11V cells have been described previously [23]. HEK293T cells were obtained from E. Cohen (University of Montreal) and were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS.

2.4.4 Transfection, selection and expression of soluble HLA-DO molecule

S2 cells (5×10^6) were transfected by $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ precipitation (Invitrogen) with 19 μg of each DNA and 1 μg pCoHygro for drug resistance. We added the selecting agent Hygromycin-B (Wisent) to the culture medium 48 hours post transfection to a final concentration of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Adding 1 mM CuSO_4 for another 7 days of culture induced expression of soluble DO and DOP-V molecules. Before induction, the S2 cells were gradually adapted to growth in Drosophila SFM medium without FBS.

2.4.5 Purification of soluble proteins

All steps were done at 4°C. The sDOP-V molecules were purified by HisTrap HP agarose chromatography as described by the manufacturer (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). Briefly, 1L of culture supernatant was concentrated 50 times on an Amicon YM-30 membrane (Millipore, Billerica, MA) and dialyzed against 20 mM sodium phosphate binding buffer, pH 7.4, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole. The solution was filtered through a 0.22 μm membrane before purification. Proteins were applied to the column, washed with binding buffer and eluted in 1 ml with binding buffer containing 200mM imidazole.

2.4.6 Production and purification of MAbs

The immunization of mice was described previously [26]. Briefly, C3H mice (Charles Rivers, St-Constant, QC) were immunized three times s.c. at two-weeks intervals with 1 mg of sDOP-V mixed with equal volume of the Complete Freund's Adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich). CFA is used for the initial injection only. P3X63Ag8.653 myeloma cells [28] were used for fusion with splenocytes at the ratio 1 : 10 (1 myeloma cell : 10 spleen cells) in 50% of polyethylene glycol 3000 Da (Sigma-Aldrich) and selected in HAT medium (5 mM hypoxanthine, 20 μ M aminopterin and 0.8 μ M thymidine) (Sigma-Aldrich). Culture supernatants from the hybridoma cells were screened by flow cytometry using DOP-V expressing HeLa cells. One hybridoma secreted a mAb that recognized DO and was cloned by limiting dilution. This clone was expanded and supernatant was precipitated overnight at 4°C in ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at 50% saturation. After centrifugation the pellet was dissolved in 5 mL H_2O and dialysed three times against PBS overnight at 4°C. The antibody was purified by immunoaffinity chromatography on goat anti-mouse agarose column (Sigma-Aldrich). The column is equilibrated with 10 column volumes of PBS. The sample solution to be bound is applied slowly and followed by 5-10 column volumes of PBS. Fractions containing antibody are eluted with 2-5 column volumes of 0.1 M glycine, 0.15 M NaCl, pH 2.4. Before, elution collection tubes were prepared by adding 50 μ l 1 M Tris-HCl, pH 9 per ml of fraction to be collected. This is to prevent denaturation of the antibody.

2.4.7 Western blot, silver staining and immunoprecipitation

Drosophila S2 cells (1×10^7) were washed with PBS and lysed at 4°C for 30 min in lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.8 and 150 mM NaCl) containing 1% Igepal® CA-630 (Nonidet P-40). One half of each of the samples was boiled for 5 min under reducing or non-reducing conditions and analyzed in 10% SDS-PAGE. The other half was analyzed at room temperature (without boiling) by SDS-PAGE in reducing or non-reducing conditions. Proteins were transferred to hybond ECL membranes (Amersham Biosciences) and blotted with anti-His6 antibodies overnight. Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (H + L) antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) was used. After washing, the membrane was developed by chemiluminescence (Roche Diagnostics) on superRX Fujifilms. Alternatively, proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by silver staining [28]. First the gel was fixed in 40 % ethanol and 10% acetic acid for 1 hour and then for 1 hour in 30% ethanol, 6.8% (w/v) sodium acetate, 1 % (v/v) glutaraldehyde and 0.25% (w/v) potassium thiosulfate. After washing with distilled H₂O (3 x 15 minutes), the gel was incubated with 0.2% (w/v) Ag₂NO₃ and 0.025% formaldehyde for 30 minutes. Following a short wash step to remove excess Ag₂NO₃, the gel was developed in 3% (w/v) K₂CO₃, 0.015% (v/v) formaldehyde, 0.004 mM Na₂S₂O₃, and stopped with 0.4 M Tris and 2% acetic acid.

Immunoprecipitations were performed overnight at 4°C using the Mags.DO5 antibody bound to protein-G coupled-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) and samples were analyzed by Western blotting.

2.4.8 Flow cytometry

HeLa and HEK293T cells (5×10^5) were washed and stained for the presence of cell surface HLA-DO using MagsDO.5 or NBDO monoclonal antibodies for 1 hour at 4 °C. For intracellular staining of S2 cells, we used anti-His6 (HLA-DO α) and M2 antibodies (HLA-DO β). *Drosophila* S2 cells (1×10^6) were first fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde for 10 minutes and then treated with 50 mM NH₄Cl for 10 minutes. Cells were permeabilized by incubation for 5 min with cold PBS containing 0,25% (v/v) Triton X-100. We used a secondary goat anti-mouse IgG (H + L) coupled to Alexa Fluor® 488 for both surface and intracellular staining. Cells were analyzed on a FACS®calibur (Becton Dickinson, Mississauga, ON).

2.5 RESULTS

2.5.1 Construction of expression vectors carrying truncated HLA-DO genes

The fact that HLA-DO heterodimer is unstable [16,22] significantly hinders its production in soluble form. Recently our group showed that a mutation on the α chain (P11V) stabilizes HLA-DO in the absence of DM [23]. We used an expression system based on the drosophila S2 cells to generate soluble wild type DO (sDO) and DOP-V (sDOP-V) heterodimers. To generate a secreted form of HLA-DO, we used the pRmHA-3 expression vector under the control of the copper inducible metallothionein promoter driving expression of recombinant proteins [29]. The pRmHA-3/DO α and pRmHA-3/DO β plasmids containing the truncated cDNA of HLA-DO α and β , were cotransfected along with pCoHygro conferring resistance to hygromycine. In order to facilitate the detection of each chain, we replaced the transmembrane and cytoplasmic domains of DO α and DO β by His6 and FLAG epitope-tags, respectively. To promote the association between the two soluble chains and to increase the stability of the molecule, a leucine zipper (LZ) motif was added in the 3' region. A cleavage site (3C PCS) was added on each chain to allow removal of the LZ domains. Finally, these vectors code for an in-frame cysteine residue, which enables presumably covalent attachment between the DO α and DO β chains through the formation of a disulfide bridge. To produce the soluble sDOP-V molecule, we used the pRmHA-3/DO α plasmid (Fig. 1), and replaced the 5' sequence of DO α by a fragment coding for the mutated protein.

2.5.2 Expression of sDO and sDOP-V heterodimers in *Drosophila melanogaster* Schneider cells

We compared the expression of sDO and sDOP-V transfected in *Drosophila* S2 cells. Stable lines were obtained after 1-2 weeks of selection and expression of the proteins was measured after induction with CuSO₄ for 5 days.

As a first assessment of the expression of DO, S2 cells were permeabilized in Triton X-100 and were detected by flow cytometry using the FLAG or DO specific mAbs (Fig. 2). The anti-FLAG M2 antibody determines the level of expression of the β chain and our results show that the level of expression of the beta chain is much higher in cells expressing sDOP-V (top panel of Fig. 2). Similar results were obtained with the Mags.DO5 antibody that recognizes a conformational determinant of HLA-DO β (Deshaies, Denzin, Thibodeau, unpublished data) (bottom panel of Fig. 2). The fact that Mags.DO5 staining is strong on sDOP-V suggests that cells express high levels of the DO α chain as well. Indeed, Mags.DO5 does not recognize free DO β chain (Diallo, Denzin, Thibodeau, unpublished data). These results may suggest that either the sDO molecule is efficiently secreted or it is poorly folded and rapidly degraded inside S2 cells. To distinguish between these possibilities we performed immunoprecipitations of sDO from the supernatant of S2 cells.

The immunoprecipitations with the antibody specific for assembled HLA-DO, Mags.DO5, indicated that sDOPV molecules were assembled as $\alpha\beta$ heterodimers. The Western blot analysis with anti-His antibody showed presence of the alpha chain for only the sDOPV immunoprecipitation (Fig. 3). These results confirm the earlier results

obtained by flow cytometry (Fig. 2) suggesting that sDOP-V is more efficiently produced and released than wild-type sDO. The fact that wild-type sDO is not recognized by Mags.DO5 despite the presence of high levels of β chains in permeabilized cells suggests that the α and β chains associate inefficiently. These results demonstrate that sDOP-V is in its appropriate native conformation both in the cells and in the supernatant.

2.5.3 Conformation of soluble molecules

Cells producing the recombinant sDOP-V were adapted to a serum-free medium for large-scale production in shaker bottles. After 7 days of induction with CuSO_4 , the supernatants were harvested, concentrated and applied to an affinity column, which retains the recombinant protein material through the 6xHis tag on alpha chain. The proteins were eluted by increasing the imidazole concentration and the concentration of proteins was on the order of 1 mg of sDOP-V per liter of supernatant as determined by Bradford using a BSA standard (data not shown).

To characterize the sDOP-V molecules, the eluted material was analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining as well as by Western blotting (Fig. 4). Silver staining analysis demonstrated a properly assembled $\alpha\beta$ sDOP-V heterodimer of about 80 kDa under non-reducing conditions (N-R) (Fig. 4A). Under reducing conditions (R), the sDO α P-V and sDO β are separated (Fig. 4A). The estimated molecular weight of the α and β chains is 42 kDa and 37 kDa, respectively. Similar results were obtained under boiled and unboiled conditions, suggesting that the sDOP-V molecule does not fold into SDS-resistant heterodimers. The presence of multiple contaminant

bands show that the 1 mg/ml yield is probably an overestimate. The results obtained by silver staining were confirmed with an analysis by Western blotting in which we used an anti-His antibody to detect the α chain (Fig. 4B). The presence of a free cysteine on the α chain may cause nonspecific associations (arrow).

2.5.4 Purification of the NBDO mAb

In absence of DM, the transmembrane and the truncated soluble forms of HLA-DO are unstable [16-17]. This can perhaps explain why there are not many mAbs directed against HLA-DO [24,26]. Thus, we used the purified sDOP-V molecule to immunize C3H mice three times. After fusion we obtained many hybridomas but only one secreted an antibody directed against HLA-DO. This mAb was called NBDO. The specificity was defined by recognition of DOP-V-transfected HeLa and 293T by flow cytometry (Fig. 5). These results demonstrate that NBDO is able to recognize HLA-DO.

2.5.5 The NBDO antibody consists exclusively of light chains

When trying to determine the isotype of the NBDO by conventional ELISA methods, we were unable to obtain a positive signal for any of the heavy chains or light chains (data not shown). Also, NBDO could not be purified using protein G-sepharose. Since a goat anti-mouse was used as secondary antibody for flow cytometry analyses, we used GAM-coupled sepharose to purify the antibody. By comparing NBDO with the antibody Mags.DO5 (IgG1, κ) on SDS-PAGE, we noticed that our antibody was unconventional, as it did not have heavy chains (Fig. 6). By Silver staining under reducing (R) conditions, both heavy and light chains of Mags.DO are clearly visible at about 58 kDa

and 29 kDa, respectively (Fig. 6A). NBDO, on the other hand, runs as a single band of about 27 kDa. Under non-reducing (N-R) conditions, most of the Mags.DO5 is present as high molecular mass complex at over 180 kDa, while NBDO remains at about 25 kDa. To better characterize the nature of NBDO, a similar gel was analysed by Western blotting using a heavy chain specific GAM antibody (Fig. 6B). On Mags.DO5, the GAM showed the presence of the heavy chain in reducing conditions. The GAM slightly reacts with the light chain. On NBDO, a very strong signal was seen at a size corresponding to the light chain. Interestingly, in non-reducing conditions a second band at about 50 kDa was observed. The 50 kDa band may represent light chain dimers. These results suggest that NBDO antibody is not a conventional antibody, but a dimer of light chains.

2.6 FIGURES

Figure 1

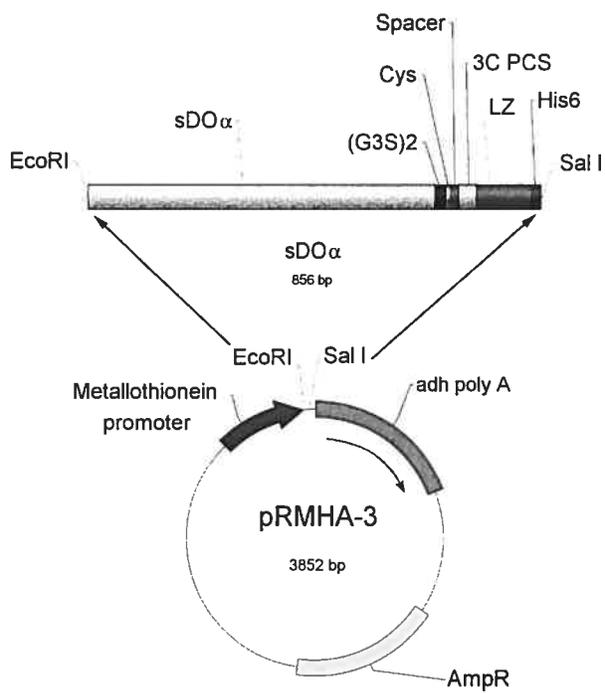


Figure 2

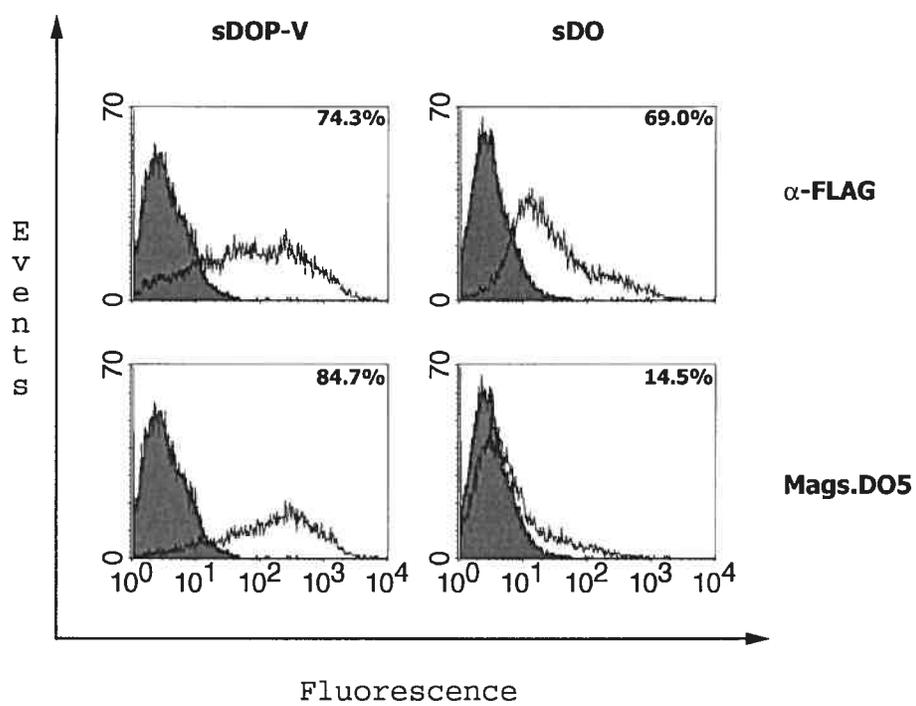


Figure 3

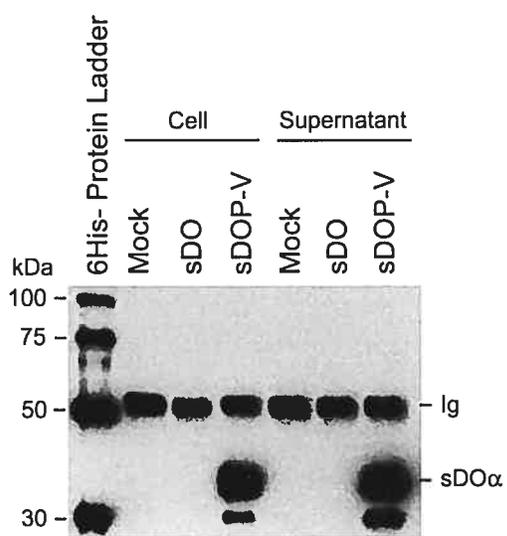


Figure 4

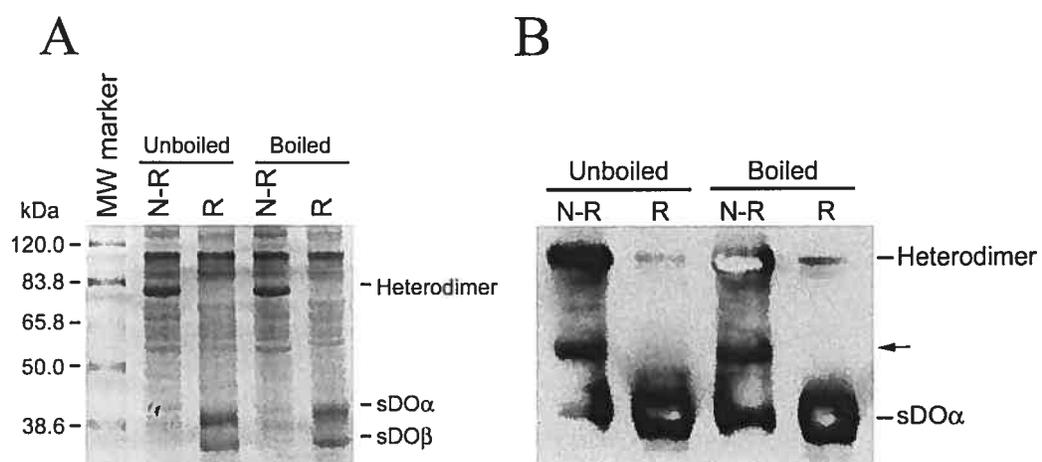


Figure 5

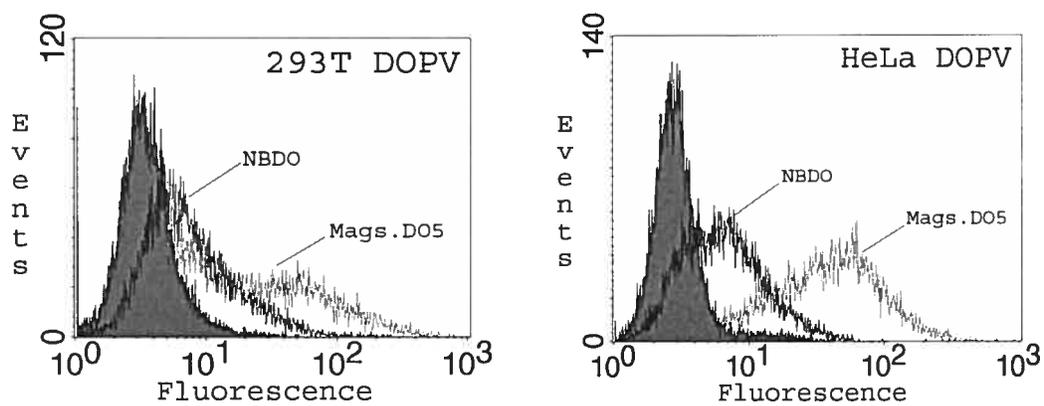
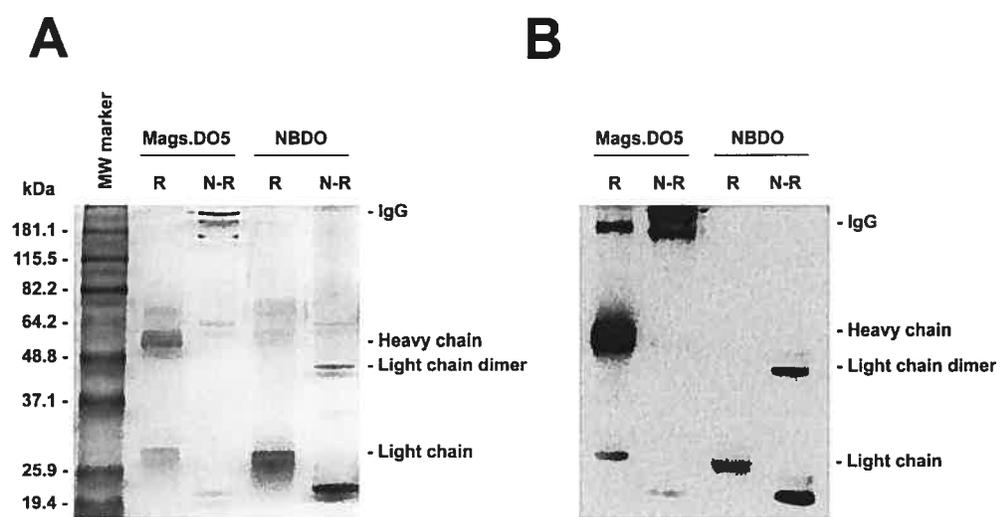


Figure 6



2.7 FIGURES LEGENDS

Figure 1 Construction of pRmHA-3/DOP-V. We have generated stable transfectants of *Drosophila* S2 cells secreting a soluble form of wild-type DO (sDO) or DOP-V (sDOP-V) heterodimers. The transmembrane and cytoplasmic domains of DO α and DO β are truncated and replaced with His6 and FLAG epitope tags, respectively. A cleavage site (3C PCS) has been added to each chain as well as AcidP1 and BaseP1 artificial leucine zipper (LZ) to help the association between the two soluble chains. sDOP-V was produced by cloning cDNAs. The presence of a free Cys residue is shown.

Figure 2 Expression of sDO and sDOP-V heterodimers in insect cells. Intracellular staining was performed on permeabilized *Drosophila* S2 cells stably transfected with sDO or sDOP-V and induced for 2 days with CuSO₄. The expression levels of soluble molecules of HLA-DO were analyzed by flow cytometry using anti-FLAG and Mags.DO5 followed by Alexa 488-conjugated goat antimouse IgG (H + L) (solid line). Filled histograms represent the control fluorescence of cells incubated with the secondary antibody only. Average values of fluorescence are indicated at the top of each histogram.

Figure 3 Conformations of soluble molecules. Immunoprecipitation analysis using *Drosophila* S2 cells lysed in 1% NP-40 or culture supernatant was performed. Samples were analyzed by Western blotting with the anti-His antibody recognizing the α chain of sDO or sDOP-V. Immunoprecipitation with Mags.DO5 antibody shows association of the α P11V with the β chain for the sDOP-V but not the wt α chain in sDO. Mock tracks are non transfected S2 cells.

Figure 4 Purification of sDOP-V. Complexes formed between sDO α P-V and sDO β were purified by HisTrap HP agarose chromatography. Purified proteins (10 μ g) were loaded in each track. **(A)** Silver staining analysis showed heterodimer complexes in non-reduced (N-R) conditions for the samples that were either unboiled or boiled. **(B)** Complex formation was detected by Western blotting using the anti-His antibody. Arrow indicates possible non-specific associations through the free cysteine at about 58 kDa.

Figure 5 Production of NBDO antibody. Purified sDOP-V from insect cells (see fig. 4) was injected to C3H mice and one hybridoma (NBDO) was obtained. Flow cytometry analysis was performed on stable HeLa DOPV and transient HEK293T transfected cells with NBDO and Mags.DO5 antibodies supernatants. Filled histograms represent the staining fluorescence of control cells incubated with the secondary antibody alone (Alexa 488-conjugated goat antimouse IgG).

Figure 6 MAb NBDO is a light-chain dimer. After purification of NBDO by immunoaffinity chromatography on GAM sepharose, the analysis of Silver staining and Western blot revealed that NBDO is not a conventional antibody. **(A)** Silver staining analysis demonstrated under reducing (R) conditions that NBDO migrates as a single chain of about 27 kDa. Heavy and light chains of control antibody Mags.DO5 are seen at about 58 kDa and 29 kDa. Under non-reducing (N-R) conditions, light chains dimer of the NBDO antibody are seen in addition to the monomers. For the control Mags.DO5, the IgG molecule is seen on the top of the lane as a high molecular weight complex. **(B)** Western blotting analysis confirms the production of the light chains dimer of the NBDO antibody.

2.8 DISCUSSION

Few antibodies directed at HLA-DO are available, reflecting its strong conservation and instability. In order to be able to immunize mice and produce anti-DO antibodies, earlier studies used DM-DO complexes. The resulting antibody was found to be directed against the β chain [16,22]. Our laboratory recently showed that the association between DM and DO to form this complex is made through the lateral side of DO's α chain, probably masking this part of DO [23]. It was speculated that this mode of interaction explains the lack of mAb against DO α . Moreover, this study also showed that one mutation in position P11V of the α chain restores an adequate folding of the molecule and is efficiently expressed at the cell surface in absence of DM.

In the present study, we have used recombinant soluble DOP-V molecules to produce a monoclonal antibody against HLA-DO. We chose to generate sDOP-V in *Drosophila melanogaster* Schneider cells [25,29] because they had been successfully used to produce soluble mouse and human MHC class I and II molecules [30-32] and for crystallographic analysis [33-35]. cDNAs were cloned into the polylinker region of the pRmHa-3 vector under control of the metallothionein promoter [29]. This promoter, once induced by copper, can produce 30-100 times more mRNA. Moreover to facilitate association between the α and β chains, we have used a leucine zipper [36,37]. Indeed, this approach was used to produce soluble I-A molecules and DQ [38,39]. Promiscuous chain pairing by IA and HLA-DQ has demonstrated the existence of mixed isotype molecules on B cell lines suggesting a low affinity between homologous chains [40-42]. Because of the weak affinity between the chains, the assembly and the transport of these molecules can be much decreased compared to I-E/HLA-DR, for

example [43,44]. Thus, it is possible to bypass weak affinity or stability between α and β chains by using a leucine zipper motif [37,45]. This approach was used to produce soluble HLA-DO molecules previously [16].

In our hands, DO produced in this fashion could not be purified in high amounts. Although the use of a leucine zipper motif increases the association chances of both DO's chains, it doesn't by itself suffice to induce correct folding to insure egress of the molecules from the ER. Indeed, the addition of this motif is insufficient to express the wild type DO molecules (Fig. 2). However, the use of the DOP-V mutant greatly increased the production of DO. These results show that the problem of wt DO α and β association isn't only a problem of affinity but a folding problem that can be compensated either by adding HLA-DM as a chaperone or by mutating the DO α 's P11 to a Valine residue. Immunoprecipitation of the sDOP-V reveals that the mutation restored the adequate folding of the molecule (Fig. 3). Moreover, functional in vitro peptide exchange assays show that sDOP-V successfully inhibits the activity of HLA-DM (data not shown). After having the confirmation that the molecule was well folded and functional, we immunized mice to derive a monoclonal antibody specific to HLA-DO.

One particular hybridoma, NBDO, was obtained. However, NBDO is not a conventional antibody but an Ig light chain dimer. Indeed, a standard antibody is a tetrameric structure being composed of two identical Ig heavy chains and two identical light chains. The variable areas of the heavy and light chains contribute to the antigen specificity [46,47]. The production of light chain dimers is possible when the hybridoma is first made. Indeed, it contains a double load of

chromosomes. As the cells divide, some of the extra chromosomes are lost [48].

Not unusual, it was also found that human blood mononuclear cells were secreting significant amounts of light chain Ig unassociated with heavy chain [49]. The majority of the free light chains exist as dimers by interchain disulfide bridges between cysteines at the last C-terminal. These cysteines are normally involved in the interaction with heavy chains [46]. Curiously, we have not been able to determine if the light chain is of the κ or λ isotypes using commercial ELISA (not shown). This may relate to the fact that the light chain seems of lower molecular weight than the one of Mags.DO5. Maybe the produced light chain is also truncated. Also, it would be necessary to pay attention to the ammonium sulfate precipitation because we can lose proteins if it is not well optimized.

Study of crystals of antigen-antibody complexes has shown that the number and area of antigen contacts with light and heavy chain residues is comparable [50]. However, the specificity of antigen binding of heavy and light chains is not the same one [51]. For example, the average binding constant of rabbit IgG to the hapten 2,4-dinitrophenyl was $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, while the heavy chain dimers and the light chain was $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $200\text{-}500 \text{ M}^{-1}$, respectively [52]. Nevertheless, another study shows an association constant of $2.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ for an Ig light chain dimer with CD4 antigen specificity [53].

In conclusion, our results demonstrate the use of the $\alpha\text{DOP-V}$ mutation for the production of soluble DO in insect cells. This allowed the generation of a monoclonal antibody directed against molecule HLA-DO. Finally, the availability of these large quantities of purified HLA-DO

molecules should enable us to embark on X-ray crystallographic studies in the near future.

2.9 ABBREVIATIONS

CLIP : class II-associated invariant chain peptide

ER : endoplasmic reticulum

GAM : goat anti-mouse

Ig : immunoglobulin

Ii : invariant chain

mAb : monoclonal antibody

MHC : major histocompatibility complex

sDO : soluble HLA-DO molecule

sDOP-V : soluble HLA-DOP-V molecule

2.10 REFERENCES

1. Cresswell P: **Invariant chain structure and MHC class II function.** *Cell* 1996, **84**: 505-507.
2. Lamb CA, Cresswell P: **Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes.** *J Immunol* 1992, **148**: 3478-3482.
3. Newcomb JR, Carboy-Newcomb C, Cresswell P: **Trimeric interactions of the invariant chain and its association with major histocompatibility complex class II alpha beta dimers.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 24249-24256.
4. Roche PA, Marks MS, Cresswell P: **Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain.** *Nature* 1991, **354**: 392-394.
5. Tulp A, Verwoerd D, Dobberstein B, Ploegh HL, Pieters J: **Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment.** *Nature* 1994, **369**: 120-126.
6. Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL *et al.*: **Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading.** *Immunity* 1996, **4**: 357-366.
7. Roche PA, Cresswell P: **Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**: 3150-3154.
8. Romagnoli P, Germain RN: **The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy.** *J Exp Med* 1994, **180**: 1107-1113.
9. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA, Jr.: **Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules.** *Nature* 1991, **353**: 622-627.
10. Kelly AP, Monaco JJ, Cho SG, Trowsdale J: **A new human HLA class II-related locus, DM.** *Nature* 1991, **353**: 571-573.

11. Fung-Leung WP, Surh CD, Liljedahl M, Pang J, Leturcq D, Peterson PA *et al.*: **Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice.** *Science* 1996, **271**: 1278-1281.
12. Martin WD, Hicks GG, Mendiratta SK, Leva HI, Ruley HE, Van Kaer L: **H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection.** *Cell* 1996, **84**: 543-550.
13. Miyazaki T, Wolf P, Tourne S, Waltzinger C, Dierich A, Barois N *et al.*: **Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway.** *Cell* 1996, **84**: 531-541.
14. Denzin LK, Sant'Angelo DB, Hammond C, Surman MJ, Cresswell P: **Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing.** *Science* 1997, **278**: 106-109.
15. Kropshofer H, Vogt AB, Thery C, Armandola EA, Li BC, Moldenhauer G *et al.*: **A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules.** *EMBO J* 1998, **17**: 2971-2981.
16. Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Wong P, Ngo K, Teyton L *et al.*: **Altered antigen presentation in mice lacking H2-O.** *Immunity* 1998, **8**: 233-243.
17. van Ham SM, Tjin EP, Lillemeier BF, Gruneberg U, van Meijgaarden KE, Pastoors L *et al.*: **HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading.** *Curr Biol* 1997, **7**: 950-957.
18. Karlsson L, Surh CD, Sprent J, Peterson PA: **A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution.** *Nature* 1991, **351**: 485-488.
19. Serenius B, Rask L, Peterson PA: **Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO beta gene is a divergent member of the class II beta gene family.** *J Biol Chem* 1987, **262**: 8759-8766.
20. Tonnelle C, DeMars R, Long EO: **DO beta: a new beta chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression.** *EMBO J* 1985, **4**: 2839-2847.

21. Trowsdale J, Kelly A: **The human HLA class II alpha chain gene DZ alpha is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions.** *EMBO J* 1985, **4**: 2231-2237.
22. Liljedahl M, Kuwana T, Fung-Leung WP, Jackson MR, Peterson PA, Karlsson L: **HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport.** *EMBO J* 1996, **15**: 4817-4824.
23. Deshaies F, Brunet A, Diallo DA, Denzin LK, Samaan A, Thibodeau J: **A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, In press.
24. Glazier KS, Hake SB, Tobin HM, Chadburn A, Schattner EJ, Denzin LK: **Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO.** *J Exp Med* 2002, **195**: 1063-1069.
25. Schneider I: **Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*.** *J Embryol Exp Morphol* 1972, **27**: 353-365.
26. Khalil H, Deshaies F, Bellemare-Pelletier A, Brunet A, Faubert A, Azar GA *et al.*: **Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells.** *Tissue Antigens* 2002, **60**: 372-382.
27. Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K: **A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines.** *J Immunol* 1979, **123**: 1548-1550.
28. Heukeshoven J, Dernick R: **Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels.** *Electrophoresis* 1988, **9**: 28-32.
29. Bunch TA, Grinblat Y, Goldstein LS: **Characterization and use of the *Drosophila* metallothionein promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**: 1043-1061.

30. Jackson MR, Song ES, Yang Y, Peterson PA: **Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**: 12117-12121.
31. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E *et al.*: **Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR.** *Nature* 1995, **375**: 802-806.
32. Wallny HJ, Sollami G, Karjalainen K: **Soluble mouse major histocompatibility complex class II molecules produced in *Drosophila* cells.** *Eur J Immunol* 1995, **25**: 1262-1266.
33. Fremont DH, Stura EA, Matsumura M, Peterson PA, Wilson IA: **Crystal structure of an H-2Kb-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**: 2479-2483.
34. Gauthier L, Smith KJ, Pyrdol J, Kalandadze A, Strominger JL, Wiley DC *et al.*: **Expression and crystallization of the complex of HLA-DR2 (DRA, DRB1*1501) and an immunodominant peptide of human myelin basic protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**: 11828-11833.
35. Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC: **The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation.** *Immunity* 1998, **9**: 377-383.
36. Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T: **A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants.** *Science* 1993, **262**: 1401-1407.
37. Harbury PB, Kim PS, Alber T: **Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer.** *Nature* 1994, **371**: 80-83.
38. Scott CA, Garcia KC, Carbone FR, Wilson IA, Teyton L: **Role of chain pairing for the production of functional soluble IA major histocompatibility complex class II molecules.** *J Exp Med* 1996, **183**: 2087-2095.

39. Siebold C, Hansen BE, Wyer JR, Harlos K, Esnouf RE, Svejgaard A *et al.*: **Crystal structure of HLA-DQ0602 that protects against type 1 diabetes and confers strong susceptibility to narcolepsy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**: 1999-2004.
40. Germain RN, Bentley DM, Quill H: **Influence of allelic polymorphism on the assembly and surface expression of class II MHC (Ia) molecules.** *Cell* 1985, **43**: 233-242.
41. Lotteau V, Teyton L, Burroughs D, Charron D: **A novel HLA class II molecule (DR alpha-DQ beta) created by mismatched isotype pairing.** *Nature* 1987, **329**: 339-341.
42. Sant AJ, Braunstein NS, Germain RN: **Predominant role of amino-terminal sequences in dictating efficiency of class II major histocompatibility complex alpha beta dimer expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**: 8065-8069.
43. Gilfillan S, Aiso S, Michie SA, McDevitt HO: **The effect of excess beta-chain synthesis on cell-surface expression of allele-mismatched class II heterodimers in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**: 7314-7318.
44. Layet C, Germain RN: **Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex A alpha A beta dimers from the endoplasmic reticulum/cis-Golgi compartment.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**: 2346-2350.
45. Chang HC, Bao Z, Yao Y, Tse AG, Goyarts EC, Madsen M *et al.*: **A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 11408-11412.
46. Novotny J, Haber E: **Structural invariants of antigen binding: comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**: 4592-4596.
47. Ramsland PA, Farrugia W: **Crystal structures of human antibodies: a detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products.** *J Mol Recognit* 2002, **15**: 248-259.

48. Masat L, Wabl M, Johnson JP: **A simpler sort of antibody.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 893-896.
49. Hopper JE, Papagiannes E: **Evidence by radioimmunoassay that mitogen-activated human blood mononuclear cells secrete significant amounts of light chain Ig unassociated with heavy chain.** *Cell Immunol* 1986, **101**: 122-131.
50. Davies DR, Padlan EA, Sheriff S: **Antibody-antigen complexes.** *Annu Rev Biochem* 1990, **59**: 439-473.
51. Sun M, Li L, Gao QS, Paul S: **Antigen recognition by an antibody light chain.** *J Biol Chem* 1994, **269**: 734-738.
52. Painter RG, Sage HJ, Tanford C: **Contributions of heavy and light chains of rabbit immunoglobulin G to antibody activity. I. Binding studies on isolated heavy and light chains.** *Biochemistry* 1972, **11**: 1327-1337.
53. Ledbetter JA, Fell HP, Grosmaire LS, Norris NA, Tsu TT: **An immunoglobulin light chain dimer with CD4 antigen specificity.** *Mol Immunol* 1987, **24**: 1255-1261.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Depuis la découverte de son implication dans la présentation antigénique, la molécule HLA-DO soulève de nombreuses questions [91,100-102]. En effet, son rôle exact n'a pas encore été élucidé. Il règne dans la littérature des contradictions concernant son activité modulatrice sur HLA-DM. Ainsi, HLA-DO pourrait inhiber, favoriser ou même encore n'avoir aucun impact sur l'activité catalytique de DM [91,100,101,103-105]. Par ailleurs, la molécule doit absolument s'associer à DM pour son transport intracellulaire [89]. Cette contrainte rend difficile les études touchant à cette molécule. En effet, DO est instable, faiblement exprimée et reste confinée au réticulum endoplasmique en absence de DM [89-91]. Donc, les études présentées dans ce mémoire mettent l'accent sur la molécule DOP-V. En effet, grâce à la mutation en position α P11V, la molécule est repliée de façon adéquate et peut être exprimée en absence de DM [107]. Ainsi, nous avons utilisé ces propriétés afin de créer des outils pour mieux caractériser DO, tout d'abord en produisant la molécule sous une forme soluble et ensuite en générant un anticorps monoclonal anti-DO.

5.1 Les molécules solubles

L'utilisation de molécules solubles peut se faire dans plusieurs contextes. En effet, on utilise de plus en plus des multimères de molécule de HLA pour la détection de cellules T spécifiques à différents antigènes dans des maladies auto-immunes ou des infections [153,154]. Par exemple, le développement d'un tétramère de classe II a permis de pour détecter des cellules T réactives à un antigène spécifique présenté par HLA-DQ dans l'Herpès de type 2 (VHS-2) [155]. Ou encore, on utilise fréquemment les molécules solubles pour obtenir la structure cristalline des molécules du CMH de classes I et II [54,109,112]. Comme le cristal de la molécule HLA-DO n'existe toujours pas et qu'avec la mutation α P11V il est possible d'obtenir une molécule stable dans une conformation adéquate. Nous avons cru qu'il aurait été possible de produire la structure cristalline de DO. Malheureusement, il a été impossible d'obtenir la structure en trois dimensions dues à des problèmes d'agrégations de la molécule soluble lors du processus de cristallisation par le laboratoire du Dr. Fremont (Washington University). Nous avons aussi remarqué qu'il y avait possiblement des liaisons non spécifiques lors de la purification des molécules sDOP-V (Chapitre 2, figure 4B). Or, ces associations non spécifiques pourraient être dues à la présence d'une cystéine en amont du site de clivage 3C PCS (Chapitre 2, figure 1). En effet, cet acide aminé possède un atome de soufre pouvant établir une liaison covalente sous forme de pont disulfure avec une autre cystéine [156]. Ces ponts disulfure peuvent être réduit par l'ajout de β -mercaptoéthanol dans le tampon de lavage lors de la purification. Toutefois, ce type de solution peut aussi dénaturer la molécule sDOP-V. Alors, comme solution de rechange on peut ajouter une concentration variant entre 0.1-1% de détergeant non-ionique tel que du Triton X-100 ou Tween 20, sans tout fois excéder une

concentration qui pourrait altérer la molécule. Par contre, cet ajout n'a pas été fait, ce qui expliquerait la présence de protéines non spécifiques dans les voies non réduites (N-R) de l'analyse d'immunobuvardage après purification (Chapitre 2, figure 4B). En conséquence, il a été impossible de produire la structure cristalline de DO.

Par la suite, une collaboration avec le laboratoire du Dr. Mellins (Stanford University) nous a permis de confirmer que la molécule sDOP-V était bien repliée. En effet, grâce à des tests fonctionnels *in vitro*, il a été démontré que sDOP-V pouvait inhiber l'activité catalytique de DM (résultats non montrés). Finalement, nous avons utilisé ces molécules solubles dans le but d'immuniser des souris et de générer des anticorps spécifiques à la molécule HLA-DO.

Un dernier point important à mentionner est le fait que sDOP-V est une protéine hétérodimérique. Ainsi, afin de favoriser l'association entre les deux chaînes, nous avons utilisé un motif de leucines à fermeture éclair (ou « *leucine zipper* ») [157,158]. En effet, ce système est fort utilisé lorsqu'une molécule est difficilement exprimable ou alors pour aider l'association entre deux molécules distinctes. Par exemple, cette technologie a été employée pour produire la molécule I-A (équivalent humain, HLA-DQ) [120]. En effet, il existe une faible affinité entre les chaînes α et β des molécule I-A et DQ [159-161]. Ceci peut s'expliquer par le fait que les chaînes de I-A et DQ ont une facilité pour s'appariées avec différents isotopes, ce qui en résulte par un transport et un assemblage des molécules plus faible que les molécules I-E et HLA-DR, par exemple [160-163]. Ainsi, il est possible de favoriser l'association des chaînes avec un motif de type « *leucine zipper* » [158,164]. Donc, dû à la ressemblance entre HLA-DO et HLA-DQ nous avons utilisé cette approche pour favoriser l'assemblage de DO

[85,165]. Mais, comme en témoignent les analyses par cytométrie en flux et d'immunoprécipitation, le motif de leucines à fermeture éclair n'a pas été suffisant pour permettre l'expression de la molécule sauvage dans les cellules de drosophiles dans notre cas (Chapitre 2, figure 2 et 3). Ce qui suppose qu'il pourrait y avoir une production de la molécule sDOP-V sans ce motif. Ainsi tel que mentionné ci-haut, cette mutation sur la chaîne α (P11V) permet la production d'une molécule repliée de façon adéquate. Cependant, il est important de mentionner que le groupe de Karlsson [91] a réussi à produire la molécule DO sous sa forme soluble en fusionnant les chaînes $\alpha\beta$ avec le domaine Fc d'une IgG1 humain. Ce qui suppose qu'il y ait eu un problème d'expression d'une des deux chaînes de la molécule sDO. En effet, en absence de $DO\alpha$, la demi-vie de la chaîne $DO\beta$ diminue considérablement [91]. Donc, il aurait fallu doser le niveau d'ARN messenger (ARNm) produit pour comparer l'expression réelle de sDO versus sDOP-V.

Finalement, voici quelques recommandations à faire pour améliorer notre système. Tout d'abord, éliminer la cystéine en amont du site de clivage 3C PCS, qui produit des liaisons non-spécifiques et provoque ainsi l'agrégation de la molécule. Et finalement, vue que la molécule DOP-V est repliée de façon adéquate il n'est probablement pas nécessaire d'y ajouter un motif de « *leucine zipper* ». Enfin, avec ces modifications peut-être qu'il serait plus facile de cristalliser la molécule sDOP-V.

5.2 Système d'expression chez les cellules de drosophile

La possibilité d'utiliser le système d'expression chez les cellules de drosophile s'est avérée une option intéressante. Tout d'abord, la production dans ces cellules permet l'obtention de quantité considérable de matériel par rapport aux cellules de mammifère. En effet, lors de la cristallisation de la molécule HLA-A2, plus de 200 L de culture de cellule a été nécessaire pour obtenir de 3 à 4 mg [124] comparativement au groupe de Mellins qui a obtenu plus de 4 mg de HLA-DM soluble dans seulement un 1 L de surnageant provenant de cellules d'insectes [166]. De plus, une autre étude, utilisant une glycoprotéine impliquée dans le transport du fer, la transferrine humaine (hTf), a démontré qu'il était possible d'atteindre une production pouvant aller jusqu'à 40,8 mg/L, [167]. On obtient aussi une meilleure glycosylation des protéines recombinantes produites chez les cellules de drosophile par rapport à celles produites chez la levure ou dans un système bactérien [168]. La glycosylation des molécules du CMH est essentiel, ainsi pour produire ces molécules il est préférable d'utiliser une glycosylation semblable au système humain [169]. Dans un même ordre d'idées, l'utilisation des cellules S2 permet d'assembler différents allèles du CMH. Tel que mentionné précédemment, on peut ajouter un motif de « *leucine zipper* » pour aider l'association d'allèles à faible affinités [112,120,129]. Autre point important à mentionner, ce système d'expression a fait ses preuves depuis de nombreuses années. Plusieurs groupes de recherche l'ont utilisé pour produire des molécules du CMH [109,115,116,119]. C'est pourquoi nous avons opté pour l'utilisation de ce système. Finalement, à l'aide du système d'expression dans les cellules de drosophile, il nous a été permis de produire de grande quantité (1 mg/ml) de la molécule sDOP-V.

5.3 Production d'un anticorps monoclonal spécifique à HLA-DO

Il existe très peu d'anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule HLA-DO [170,171]. Ceci peut s'expliquer par la problématique de produire la molécule en absence de DM [89-91]. Ainsi, l'une des possibilités pour générer un anti-DO est d'utiliser des complexes DM-DO. Par contre, jusqu'à maintenant, cette méthode a permis la production d'anticorps dirigés contre la chaîne β seulement [170]. Or, notre laboratoire a démontré que la liaison entre DM et DO se produisait du côté latéral et sur chaîne $DO\alpha$ [107]. Donc, seule la chaîne β est exposée lors d'immunisation utilisant des complexes DM-DO. C'est ainsi, que nous avons pensé qu'en utilisant la molécule sDOP-V nous aurions pu obtenir un anticorps dirigé contre la chaîne $DO\alpha$. En effet, nous avons bel et bien obtenu un AcM contre HLA-DO. Ainsi, suite au criblage des hybridomes obtenus, un seul hybridome produisant des anticorps reconnaissant la molécule HLA-DOP-V à la surface des cellules HeLa et HEK293T transfectées a été trouvé (Chapitre 2, figure 5). Les ajouts des motifs de « *leucine zipper* », des épitopes 6xHis et FLAG ainsi que les sites de coupures (3C PCS), remplaçant les régions transmembranaires et cytoplasmiques ont certainement contribuer à produire des anticorps contre ces régions au lieu de la molécule DO en tant que telle. Ceci peut probablement expliquer pourquoi nous n'avons obtenue qu'un seul hybridome produisant des anticorps dirigés contre HLA-DO. Ainsi, pour optimiser notre technique, il aurait fallu enlever toutes les parties non-spécifiques de la molécule. Donc, en injectant les molécules digérées à l'aide de la protéase spécifique au site de coupure 3C PCS (résultats non montrés) nous aurions augmenté nos chances de générer plusieurs hybridomes produisant des AcM anti-DO.

De plus, il fut impossible de déterminer l'isotype de cet AcM, tout d'abord parce que celui ne possède pas de chaînes lourdes (Chapitre 2, figure 6). En effet, un anticorps conventionnel est une structure tétramérique se composant de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères également identiques (Chapitre 1, figure 1.9). Cette absence de chaîne lourde pourrait s'expliquer par une délétion de chromosome au moment de la première division suite à la fusion d'un splénocyte et d'une cellule de myélome [172,173].

Ainsi, cet anticorps c'est avéré à être un dimère de chaînes légères (Chapitre 2, figure 6). Par ailleurs, il a été démontré qu'il pouvait y avoir sécrétion significative de chaînes légères non associées à des chaînes lourdes dans la circulation sanguine [174]. La majorité de ces chaînes légères libres sont associées en dimères. Cette dimérisation pourrait être rendue possible suite à la formation de ponts disulfures entre les cystéines de la portion C-terminale normalement impliquées dans l'interaction avec les chaînes lourdes [175]. Ce sont les parties variables des chaînes lourdes et légères qui sont responsables de la spécificité de l'anticorps pour un antigène donné [175,176]. Des études portées sur la structure cristalline des complexes antigène-anticorps ont démontré que les points de contacts entre l'antigène et les chaînes lourdes ou légères étaient comparables [177]. Toutefois, la spécificité de liaison entre l'Ag et les chaînes lourdes ou légères ne sont pas les mêmes [178]. Par exemple, la constante de liaison (M) moyenne pour un IgG de lapin dirigé contre un haptène, le 2,4-dinitrophényl, est de $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ alors que pour les dimères de chaînes lourdes et légères, les constantes se situaient à $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ et $200\text{-}500 \text{ M}^{-1}$, respectivement [179]. Néanmoins, une autre étude montre qu'il peut y avoir une constante de liaison de $2,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ pour un dimère de chaînes légères spécifique à CD4 [180]. Ainsi, toutes ces études confirment qu'un

anticorps de dimère de chaînes légères peut être aussi efficace que n'importe quels anticorps complets. De plus une étude révèle que l'utilisation de ce type d'anticorps pourrait avoir des applications thérapeutiques [181]. En effet, grâce à leur petite taille, il leur est plus facile possible de pénétrer dans certains tissus cancéreux [182].

Finalement, il est fort probable que ce dimère de chaînes légères soit de type kappa (κ), car chez la souris on retrouve plus de 95% de ce type de chaînes légères [183]. Pour confirmer ceci, il faudra utiliser un anticorps secondaire anti- κ . De plus, il faudrait porter une attention particulière à la précipitation au sulfate d'ammonium. Car, si la plupart des anticorps précipitent à une saturation de 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ il serait préférable d'augmenter la concentration de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 80% pour mieux précipiter des dimères [184] ou sinon penser à utiliser la production d'ascites. Pour terminer, il resterait aussi à trouver le déterminant antigénique de cet anticorps. En effet, à l'aide de cellules exprimant des molécules chimériques de $\text{DO}\alpha/\text{DR}\beta$ et $\text{DR}\alpha/\text{DO}\beta$ il serait possible de déterminer si l'anticorps est dirigé contre la chaîne α et/ou β [107,185].

CHAPITRE 4
CONCLUSION

Les objectifs de ce projet de maîtrise se sont articulés principalement autour de deux axes. Le premier concerne la production de molécules DO solubles dans un système d'expression utilisant des cellules de drosophile. Le second axe s'intéressait plutôt à l'obtention d'un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule HLA-DO.

Tout d'abord, la production de la molécule sDOP-V dans les cellules de drosophile nous a permis de mieux caractériser cette molécule. En effet, il a été possible de produire un hétérodimère ayant un repliement adéquat permettant par exemple d'agir sur DM. Ainsi, cette molécule pourrait être utilisée dans différent contexte. Par exemple, nous pourrions déterminer, par des tests fonctionnels *in vitro*, s'il existe un niveau de saturation complète qui inhiberait totalement l'activité de DM. Aucune études à ce jour n'ont démontré une inhibition complète de DM par HLA-DO.

Malheureusement, il fut impossible de produire la structure cristalline de HLA-DO. En effet, la production en grande quantité ainsi que l'obtention d'un cristal s'échelonne sur une période de plusieurs mois d'ajustement. Mais, il serait intéressant de faire quelques modifications permettant une meilleure production de molécules solubles sans agrégations pour obtenir un cristal de DO.

Finalement, nous avons obtenus un anticorps monoclonal contre HLA-DO. Cet AcM pourra être utilisé pour la caractérisation molécule de HLA-DO. Par contre, il faudrait recommencer peut-être l'immunisation avec quelques petites modifications au niveau de la production de la molécule soluble pour obtenir plus d'hybridomes produisant des anticorps dirigés contre la chaîne α . En effet, il n'existe encore aucun anticorps spécifique à cette chaîne. Il serait intéressant d'avoir ce type

d'anticorps pour déceler si dans certaines circonstances s'il pourrait avoir appariement entre la chaîne $DO\alpha$ et la chaîne β d'une molécule de classe II classique, par exemple.

En conclusion, ces outils permettront de mieux comprendre le mécanisme d'action et le rôle de HLA-DO dans la présentation antigénique.

CHAPITRE 5
BIBLIOGRAPHIE

1. SNELL GD: **A fifth allele at the histocompatibility-2 locus of the mouse as determined by tumor transplantation.** *J Natl Cancer Inst* 1951, **11**: 1299-1305.
2. SNELL GD, HIGGINS GF: **Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation.** *Genetics* 1951, **36**: 306-310.
3. Boss JM: **Regulation of transcription of MHC class II genes.** *Curr Opin Immunol* 1997, **9**: 107-113.
4. Marsh SG: **Nomenclature for factors of the HLA system, update December 2002.** *Tissue Antigens* 2003, **61**: 412-413.
5. Tiercy JM: **Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation.** *Transpl Immunol* 2002, **9**: 173-180.
6. Martinez CK, Monaco JJ: **Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene.** *Nature* 1991, **353**: 664-667.
7. Glynn R, Kerr LA, Mockridge I, Beck S, Kelly A, Trowsdale J: **The major histocompatibility complex-encoded proteasome component LMP7: alternative first exons and post-translational processing.** *Eur J Immunol* 1993, **23**: 860-866.
8. Pamer E, Cresswell P: **Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing.** *Annu Rev Immunol* 1998, **16**: 323-358.
9. Abele R, Tampe R: **The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing.** *Physiology (Bethesda)* 2004, **19**: 216-224.
10. Ting JP, Trowsdale J: **Genetic control of MHC class II expression.** *Cell* 2002, **109 Suppl**: S21-S33.
11. Zhu XS, Linhoff MW, Li G, Chin KC, Maity SN, Ting JP: **Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF- κ B, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**: 6051-6061.

12. Steimle V, Durand B, Barras E, Zufferey M, Hadam MR, Mach B *et al.*: **A novel DNA-binding regulatory factor is mutated in primary MHC class II deficiency (bare lymphocyte syndrome).** *Genes Dev* 1995, **9**: 1021-1032.
13. Emery P, Durand B, Mach B, Reith W: **RFX proteins, a novel family of DNA binding proteins conserved in the eukaryotic kingdom.** *Nucleic Acids Res* 1996, **24**: 803-807.
14. Reith W, Steimle V, Mach B: **Molecular defects in the bare lymphocyte syndrome and regulation of MHC class II genes.** *Immunol Today* 1995, **16**: 539-546.
15. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL *et al.*: **Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1.** *Nature* 1993, **364**: 33-39.
16. Kaufman JF, Auffray C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger J: **The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex.** *Cell* 1984, **36**: 1-13.
17. Springer TA, Kaufman JF, Terhorst C, Strominger JL: **Purification and structural characterisation of human HLA-linked B-cell antigens.** *Nature* 1977, **268**: 213-218.
18. Konig R, Huang LY, Germain RN: **MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8.** *Nature* 1992, **356**: 796-798.
19. Williams AF, Barclay AN: **The immunoglobulin superfamily-- domains for cell surface recognition.** *Annu Rev Immunol* 1988, **6**: 381-405.
20. Chicz RM, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DA *et al.*: **Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size.** *Nature* 1992, **358**: 764-768.
21. Benacerraf B: **Role of MHC gene products in immune regulation.** *Science* 1981, **212**: 1229-1238.
22. Germain RN, Margulies DH: **The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation.** *Annu Rev Immunol* 1993, **11**: 403-450.

23. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA, Jr.: **Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules.** *Nature* 1991, **353**: 622-627.
24. Sant AJ, Miller J: **MHC class II antigen processing: biology of invariant chain.** *Curr Opin Immunol* 1994, **6**: 57-63.
25. Roche PA, Marks MS, Cresswell P: **Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain.** *Nature* 1991, **354**: 392-394.
26. Lamb CA, Cresswell P: **Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes.** *J Immunol* 1992, **148**: 3478-3482.
27. Cresswell P: **Chemistry and functional role of the invariant chain.** *Curr Opin Immunol* 1992, **4**: 87-92.
28. Newcomb JR, Carboy-Newcomb C, Cresswell P: **Trimeric interactions of the invariant chain and its association with major histocompatibility complex class II alpha beta dimers.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 24249-24256.
29. Cresswell P: **Invariant chain structure and MHC class II function.** *Cell* 1996, **84**: 505-507.
30. Bikoff EK, Huang LY, Episkopou V, van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ: **Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression.** *J Exp Med* 1993, **177**: 1699-1712.
31. Viville S, Neefjes J, Lotteau V, Dierich A, Lemeur M, Ploegh H *et al.*: **Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain.** *Cell* 1993, **72**: 635-648.
32. Pieters J, Bakke O, Dobberstein B: **The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail.** *J Cell Sci* 1993, **106 (Pt 3)**: 831-846.
33. Odorizzi CG, Trowbridge IS, Xue L, Hopkins CR, Davis CD, Collawn JF: **Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment.** *J Cell Biol* 1994, **126**: 317-330.

34. Kang S, Liang L, Parker CD, Collawn JF: **Structural requirements for major histocompatibility complex class II invariant chain endocytosis and lysosomal targeting.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 20644-20652.
35. Roche PA, Teletski CL, Karp DR, Pinet V, Bakke O, Long EO: **Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR.** *EMBO J* 1992, **11**: 2841-2847.
36. Maric MA, Taylor MD, Blum JS: **Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 2171-2175.
37. Roche PA, Cresswell P: **Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**: 3150-3154.
38. Driessen C, Bryant RA, Lennon-Dumenil AM, Villadangos JA, Bryant PW, Shi GP *et al.*: **Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells.** *J Cell Biol* 1999, **147**: 775-790.
39. Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J *et al.*: **Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus.** *Science* 1998, **280**: 450-453.
40. Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL *et al.*: **Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading.** *Immunity* 1996, **4**: 357-366.
41. Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ *et al.*: **Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development.** *Immunity* 1999, **10**: 197-206.
42. Villadangos JA, Bryant RA, Deussing J, Driessen C, Lennon-Dumenil AM, Riese RJ *et al.*: **Proteases involved in MHC class II antigen presentation.** *Immunol Rev* 1999, **172**: 109-120.
43. Riese RJ, Mitchell RN, Villadangos JA, Shi GP, Palmer JT, Karp ER *et al.*: **Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity.** *J Clin Invest* 1998, **101**: 2351-2363.

44. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC: **The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3.** *Nature* 1995, **378**: 457-462.
45. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ: **Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments.** *Nature* 1991, **349**: 669-676.
46. Kleijmeer MJ, Raposo G, Geuze HJ: **Characterization of MHC Class II Compartments by Immunoelectron Microscopy.** *Methods* 1996, **10**: 191-207.
47. Sette A, Southwood S, Miller J, Appella E: **Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain-derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II.** *J Exp Med* 1995, **181**: 677-683.
48. Amigorena S, Drake JR, Webster P, Mellman I: **Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes.** *Nature* 1994, **369**: 113-120.
49. Qiu Y, Xu X, Wandinger-Ness A, Dalke DP, Pierce SK: **Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II.** *J Cell Biol* 1994, **125**: 595-605.
50. West MA, Lucocq JM, Watts C: **Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells.** *Nature* 1994, **369**: 147-151.
51. Kleijmeer MJ, Morkowski S, Griffith JM, Rudensky AY, Geuze HJ: **Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments.** *J Cell Biol* 1997, **139**: 639-649.
52. Geuze HJ: **The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning.** *Immunol Today* 1998, **19**: 282-287.
53. Fremont DH, Crawford F, Marrack P, Hendrickson WA, Kappler J: **Crystal structure of mouse H2-M.** *Immunity* 1998, **9**: 385-393.

54. Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC: **The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation.** *Immunity* 1998, **9**: 377-383.
55. Kelly AP, Monaco JJ, Cho SG, Trowsdale J: **A new human HLA class II-related locus, DM.** *Nature* 1991, **353**: 571-573.
56. Sanderson F, Powis SH, Kelly AP, Trowsdale J: **Limited polymorphism in HLA-DM does not involve the peptide binding groove.** *Immunogenetics* 1994, **39**: 56-58.
57. Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly A, Verwoerd D, Tulp A, Neefjes JJ *et al.*: **Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments.** *Science* 1994, **266**: 1566-1569.
58. Copier J, Kleijmeer MJ, Ponnambalam S, Oorschot V, Potter P, Trowsdale J *et al.*: **Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB.** *J Immunol* 1996, **157**: 1017-1027.
59. Marks MS, Roche PA, van Donselaar E, Woodruff L, Peters PJ, Bonifacino JS: **A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments.** *J Cell Biol* 1995, **131**: 351-369.
60. Pierre P, Denzin LK, Hammond C, Drake JR, Amigorena S, Cresswell P *et al.*: **HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments.** *Immunity* 1996, **4**: 229-239.
61. Chang CH, Flavell RA: **Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation.** *J Exp Med* 1995, **181**: 765-767.
62. Kern I, Steimle V, Siegrist CA, Mach B: **The two novel MHC class II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes.** *Int Immunol* 1995, **7**: 1295-1299.
63. Hake SB, Tobin HM, Steimle V, Denzin LK: **Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes.** *Eur J Immunol* 2003, **33**: 2361-2371.

64. Kropshofer H, Hammerling GJ, Vogt AB: **The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules.** *Immunol Rev* 1999, **172**: 267-278.
65. Alfonso C, Karlsson L: **Nonclassical MHC class II molecules.** *Annu Rev Immunol* 2000, **18**: 113-142.
66. Vogt AB, Kropshofer H: **HLA-DM - an endosomal and lysosomal chaperone for the immune system.** *Trends Biochem Sci* 1999, **24**: 150-154.
67. Fling SP, Arp B, Pious D: **HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells.** *Nature* 1994, **368**: 554-558.
68. Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C *et al.*: **An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules.** *Nature* 1994, **368**: 551-554.
69. Denzin LK, Cresswell P: **HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading.** *Cell* 1995, **82**: 155-165.
70. Sherman MA, Weber DA, Jensen PE: **DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide.** *Immunity* 1995, **3**: 197-205.
71. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E *et al.*: **Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR.** *Nature* 1995, **375**: 802-806.
72. van Ham SM, Gruneberg U, Malcherek G, Broker I, Melms A, Trowsdale J: **Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs.** *J Exp Med* 1996, **184**: 2019-2024.
73. Vogt AB, Kropshofer H, Moldenhauer G, Hammerling GJ: **Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**: 9724-9729.
74. Kropshofer H, Vogt AB, Moldenhauer G, Hammer J, Blum JS, Hammerling GJ: **Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM.** *EMBO J* 1996, **15**: 6144-6154.

75. Sanderson F, Thomas C, Neefjes J, Trowsdale J: **Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo.** *Immunity* 1996, **4**: 87-96.
76. Kropshofer H, Arndt SO, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Vogt AB: **HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH.** *Immunity* 1997, **6**: 293-302.
77. Denzin LK, Hammond C, Cresswell P: **HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules.** *J Exp Med* 1996, **184**: 2153-2165.
78. Pashine A, Busch R, Belmares MP, Munning JN, Doebele RC, Buckingham M *et al.*: **Interaction of HLA-DR with an acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides.** *Immunity* 2003, **19**: 183-192.
79. Ullrich HJ, Doring K, Gruneberg U, Jahnig F, Trowsdale J, van Ham SM: **Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**: 13163-13168.
80. Doebele RC, Busch R, Scott HM, Pashine A, Mellins ED: **Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules.** *Immunity* 2000, **13**: 517-527.
81. Zwart W, Griekspoor A, Kuijl C, Marsman M, van Rheenen J, Janssen H *et al.*: **Spatial Separation of HLA-DM/HLA-DR Interactions within MIIC and Phagosome-Induced Immune Escape.** *Immunity* 2005, **22**: 221-233.
82. Klein J, Sato A: **The HLA system. First of two parts.** *N Engl J Med* 2000, **343**: 702-709.
83. Servenius B, Rask L, Peterson PA: **Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO beta gene is a divergent member of the class II beta gene family.** *J Biol Chem* 1987, **262**: 8759-8766.
84. Tonnelle C, DeMars R, Long EO: **DO beta: a new beta chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression.** *EMBO J* 1985, **4**: 2839-2847.

85. Trowsdale J, Kelly A: **The human HLA class II alpha chain gene DZ alpha is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions.** *EMBO J* 1985, **4**: 2231-2237.
86. Karlsson L, Surh CD, Sprent J, Peterson PA: **A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution.** *Nature* 1991, **351**: 485-488.
87. Douek DC, Altmann DM: **HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression.** *Int Immunol* 1997, **9**: 355-364.
88. Taxman DJ, Cressman DE, Ting JP: **Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer.** *J Immunol* 2000, **165**: 1410-1416.
89. Liljedahl M, Kuwana T, Fung-Leung WP, Jackson MR, Peterson PA, Karlsson L: **HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport.** *EMBO J* 1996, **15**: 4817-4824.
90. Fung-Leung WP, Surh CD, Liljedahl M, Pang J, Leturcq D, Peterson PA *et al.*: **Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice.** *Science* 1996, **271**: 1278-1281.
91. Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Wong P, Ngo K, Teyton L *et al.*: **Altered antigen presentation in mice lacking H2-O.** *Immunity* 1998, **8**: 233-243.
92. Brunet A, Samaan A, Deshaies F, Kindt TJ, Thibodeau J: **Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta.** *J Biol Chem* 2000, **275**: 37062-37071.
93. van Lith M, van Ham M, Griekspoor A, Tjin E, Verwoerd D, Calafat J *et al.*: **Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body.** *J Immunol* 2001, **167**: 884-892.
94. Jonsson AK, Rask L: **Human class II DNA and DOB genes display low sequence variability.** *Immunogenetics* 1989, **29**: 411-413.

95. Naruse TK, Kawata H, Anzai T, Takashige N, Kagiya M, Nose Y *et al.*: **Limited polymorphism in the HLA-DOA gene.** *Tissue Antigens* 1999, **53**: 359-365.
96. Naruse TK, Kawata H, Inoko H, Isshiki G, Yamano K, Hino M *et al.*: **The HLA-DOB gene displays limited polymorphism with only one amino acid substitution.** *Tissue Antigens* 2002, **59**: 512-519.
97. Decker DJ, Stewart BS, Lehman N: **Major histocompatibility complex class II DOA sequences from three Antarctic seal species verify stabilizing selection on the DO locus.** *Tissue Antigens* 2002, **60**: 534-538.
98. Trowsdale J: **"Both man & bird & beast": comparative organization of MHC genes.** *Immunogenetics* 1995, **41**: 1-17.
99. Soll SJ, Stewart BS, Lehman N: **Conservation of MHC class II DOA sequences among carnivores.** *Tissue Antigens* 2005, **65**: 283-286.
100. Denzin LK, Sant'Angelo DB, Hammond C, Surman MJ, Cresswell P: **Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing.** *Science* 1997, **278**: 106-109.
101. Kropshofer H, Vogt AB, They C, Armandola EA, Li BC, Moldenhauer G *et al.*: **A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules.** *EMBO J* 1998, **17**: 2971-2981.
102. van Ham SM, Tjin EP, Lillemeier BF, Gruneberg U, van Meijgaarden KE, Pastoors L *et al.*: **HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading.** *Curr Biol* 1997, **7**: 950-957.
103. van Ham M, van Lith M, Lillemeier B, Tjin E, Gruneberg U, Rahman D *et al.*: **Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO.** *J Exp Med* 2000, **191**: 1127-1136.
104. Brocke P, Armandola E, Garbi N, Hammerling GJ: **Downmodulation of antigen presentation by H2-O in B cell lines and primary B lymphocytes.** *Eur J Immunol* 2003, **33**: 411-421.

105. Alfonso C, Williams GS, Han JO, Westberg JA, Winqvist O, Karlsson L: **Analysis of H2-O influence on antigen presentation by B cells.** *J Immunol* 2003, **171**: 2331-2337.
106. Alfonso C, Williams GS, Karlsson L: **H2-O influence on antigen presentation in H2-E-expressing mice.** *Eur J Immunol* 2003, **33**: 2014-2021.
107. Deshaies F, Brunet A, Diallo DA, Denzin LK, Samaan A, Thibodeau J: **A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, In press.
108. Fremont DH, Monnaie D, Nelson CA, Hendrickson WA, Unanue ER: **Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme.** *Immunity* 1998, **8**: 305-317.
109. Fremont DH, Stura EA, Matsumura M, Peterson PA, Wilson IA: **Crystal structure of an H-2Kb-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**: 2479-2483.
110. Scott CA, Garcia KC, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA, Teyton L: **Engineering protein for X-ray crystallography: the murine Major Histocompatibility Complex class II molecule I-Ad.** *Protein Sci* 1998, **7**: 413-418.
111. Corper AL, Stratmann T, Apostolopoulos V, Scott CA, Garcia KC, Kang AS *et al.*: **A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes.** *Science* 2000, **288**: 505-511.
112. Gauthier L, Smith KJ, Pyrdol J, Kalandadze A, Strominger JL, Wiley DC *et al.*: **Expression and crystallization of the complex of HLA-DR2 (DRA, DRB1*1501) and an immunodominant peptide of human myelin basic protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**: 11828-11833.
113. Khandekar SS, Mayer RJ, Cusimano DM, Katchur SR, Appelbaum ER: **Expression and purification of stable 33-kDa soluble human CD23 using the Drosophila S2 expression system.** *Protein Expr Purif* 2001, **22**: 330-336.

114. Mallender WD, Yager D, Onstead L, Nichols MR, Eckman C, Sambamurti K *et al.*: **Characterization of recombinant, soluble beta-secretase from an insect cell expression system.** *Mol Pharmacol* 2001, **59**: 619-626.
115. Jackson MR, Song ES, Yang Y, Peterson PA: **Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**: 12117-12121.
116. Matsumura M, Saito Y, Jackson MR, Song ES, Peterson PA: **In vitro peptide binding to soluble empty class I major histocompatibility complex molecules isolated from transfected *Drosophila melanogaster* cells.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 23589-23595.
117. Saito Y, Peterson PA, Matsumura M: **Quantitation of peptide anchor residue contributions to class I major histocompatibility complex molecule binding.** *J Biol Chem* 1993, **268**: 21309-21317.
118. Holcombe HR, Castano AR, Cheroutre H, Teitell M, Maher JK, Peterson PA *et al.*: **Nonclassical behavior of the thymus leukemia antigen: peptide transporter-independent expression of a nonclassical class I molecule.** *J Exp Med* 1995, **181**: 1433-1443.
119. Wallny HJ, Sollami G, Karjalainen K: **Soluble mouse major histocompatibility complex class II molecules produced in *Drosophila* cells.** *Eur J Immunol* 1995, **25**: 1262-1266.
120. Scott CA, Garcia KC, Carbone FR, Wilson IA, Teyton L: **Role of chain pairing for the production of functional soluble IA major histocompatibility complex class II molecules.** *J Exp Med* 1996, **183**: 2087-2095.
121. Hausmann DH, Yu B, Hausmann S, Wucherpfennig KW: **pH-dependent peptide binding properties of the type I diabetes-associated I-Ag7 molecule: rapid release of CLIP at an endosomal pH.** *J Exp Med* 1999, **189**: 1723-1734.

122. Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Cannella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J *et al.*: **Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex.** *J Exp Med* 2000, **191**: 1395-1412.
123. Busch R, Pashine A, Garcia KC, Mellins ED: **Stabilization of soluble, low-affinity HLA-DM/HLA-DR1 complexes by leucine zippers.** *J Immunol Methods* 2002, **263**: 111-121.
124. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC: **Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2.** *Nature* 1987, **329**: 506-512.
125. O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA: **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual.** New York, N.Y.: 1992:p.28.
126. Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN: **Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **62**: 1-20.
127. Lee DF, Chen CC, Hsu TA, Juang JL: **A baculovirus superinfection system: efficient vehicle for gene transfer into Drosophila S2 cells.** *J Virol* 2000, **74**: 11873-11880.
128. Di Nocera PP, Dawid IB: **Transient expression of genes introduced into cultured cells of Drosophila.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**: 7095-7098.
129. Malone RW, Felgner PL, Verma IM: **Cationic liposome-mediated RNA transfection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**: 6077-6081.
130. Schneider I: **Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster.** *J Embryol Exp Morphol* 1972, **27**: 353-365.
131. Bunch TA, Grinblat Y, Goldstein LS: **Characterization and use of the Drosophila metallothionein promoter in cultured Drosophila melanogaster cells.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**: 1043-1061.

132. Davis MM, Bjorkman PJ: **T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.** *Nature* 1988, **334**: 395-402.
133. Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE, Poljak RJ: **Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution.** *Science* 1986, **233**: 747-753.
134. Kohler G, Milstein C: **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature* 1975, **256**: 495-497.
135. Basalp A, Yucel F: **Development of mouse hybridomas by fusion of myeloma cells with lymphocytes derived from spleen, lymph node, and bone marrow.** *Hybrid Hybridomics* 2003, **22**: 329-331.
136. Potter M, Pumphrey JG, Walters JL: **Growth of primary plasmacytomas in the mineral oil-conditioned peritoneal environment.** *J Natl Cancer Inst* 1972, **49**: 305-308.
137. Hendriksen CF, de Leeuw W: **Production of monoclonal antibodies by the ascites method in laboratory animals.** *Res Immunol* 1998, **149**: 535-542.
138. Brodeur BR, Tsang PS: **High yield monoclonal antibody production in ascites.** *J Immunol Methods* 1986, **86**: 239-241.
139. Hendriksen CF: **A call for a European prohibition of monoclonal antibody (mAb) production by the ascites procedure in laboratory animals.** *ATLA* 1998, **26**: 523-540.
140. Marx U: **Membrane-based cell culture technologies: a scientifically and economically satisfactory alternative to malignant ascites production for monoclonal antibodies.** *Res Immunol* 1998, **149**: 557-559.
141. Pistillo MP, Sguerso V, Ferrara GB: **High yields of anti-HLA human monoclonal antibodies can be provided by SCID mice.** *Hum Immunol* 1992, **35**: 256-259.
142. de Geus B, Hendriksen CF: **In vivo and in vitro production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives. Introduction.** *Res Immunol* 1998, **149**: 533-534.

143. Falkenberg FW, Weichert H, Krane M, Bartels I, Palme M, Nagels HO *et al.*: **In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular minifermenter.** *J Immunol Methods* 1995, **179**: 13-29.
144. Peterson NC: **Considerations for in vitro monoclonal antibody production.** *Res Immunol* 1998, **149**: 553-557.
145. Trebak M, Chong JM, Herlyn D, Speicher DW: **Efficient laboratory-scale production of monoclonal antibodies using membrane-based high-density cell culture technology.** *J Immunol Methods* 1999, **230**: 59-70.
146. CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX: **Lignes directrices du CCPA : production d'anticorps. 47pp.** CCPA 2002,
http://www.ccac.ca/fr/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GDLI_NES/Antibody/antibody.pdf.
147. Knuth MW, Okragly AJ, Lesley SA, Haak-Frendscho M: **Facile generation and use of immunogenic polypeptide fusions to a sparingly soluble non-antigenic protein carrier.** *J Immunol Methods* 2000, **236**: 53-69.
148. Jennings VM: **Review of selected adjuvants used in antibody production.** *ILAR* 1995, **37**: 119-125.
149. FREUND J: **Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil.** *Proc Soc Exp Biol* 1937, **37**: 509-513.
150. FREUND J: **The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization; a review.** *Am J Clin Pathol* 1951, **21**: 645-656.
151. Broderson JR: **A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant.** *Lab Anim Sci* 1989, **39**: 400-405.
152. Lipman NS, Trudel LJ, Murphy JC, Sahali Y: **Comparison of immune response potentiation and in vivo inflammatory effects of Freund's and RIBI adjuvants in mice.** *Lab Anim Sci* 1992, **42**: 193-197.

153. Bill JR, Kotzin BL: **Use of soluble MHC class II/peptide multimers to detect antigen-specific T cells in human disease.** *Arthritis Res* 2002, **4**: 261-265.
154. Sun MY, Bowness P: **MHC class I multimers.** *Arthritis Res* 2001, **3**: 265-269.
155. Kwok WW, Liu AW, Novak EJ, Gebe JA, Ettinger RA, Nepom GT *et al.*: **HLA-DQ tetramers identify epitope-specific T cells in peripheral blood of herpes simplex virus type 2-infected individuals: direct detection of immunodominant antigen-responsive cells.** *J Immunol* 2000, **164**: 4244-4249.
156. Bieri S, Djordjevic JT, Daly NL, Smith R, Kroon PA: **Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain.** *Biochemistry* 1995, **34**: 13059-13065.
157. Harbury PB, Zhang T, Kim PS, Alber T: **A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants.** *Science* 1993, **262**: 1401-1407.
158. Harbury PB, Kim PS, Alber T: **Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer.** *Nature* 1994, **371**: 80-83.
159. Germain RN, Bentley DM, Quill H: **Influence of allelic polymorphism on the assembly and surface expression of class II MHC (Ia) molecules.** *Cell* 1985, **43**: 233-242.
160. Lotteau V, Teyton L, Burroughs D, Charron D: **A novel HLA class II molecule (DR alpha-DQ beta) created by mismatched isotype pairing.** *Nature* 1987, **329**: 339-341.
161. Sant AJ, Braunstein NS, Germain RN: **Predominant role of amino-terminal sequences in dictating efficiency of class II major histocompatibility complex alpha beta dimer expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**: 8065-8069.
162. Gilfillan S, Aiso S, Michie SA, McDevitt HO: **The effect of excess beta-chain synthesis on cell-surface expression of allele-mismatched class II heterodimers in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**: 7314-7318.

163. Layet C, Germain RN: **Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex A alpha A beta dimers from the endoplasmic reticulum/cis-Golgi compartment.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**: 2346-2350.
164. Chang HC, Bao Z, Yao Y, Tse AG, Goyarts EC, Madsen M *et al.*: **A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 11408-11412.
165. Blanck G, Strominger JL: **Molecular organization of the DQ subregion (DO-DX-DV-DQ) of the human MHC and its evolutionary implications.** *J Immunol* 1988, **141**: 1734-1737.
166. Busch R, Reich Z, Zaller DM, Sloan V, Mellins ED: **Secondary structure composition and pH-dependent conformational changes of soluble recombinant HLA-DM.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 27557-27564.
167. Lim HJ, Kim YK, Hwang DS, Cha HJ: **Expression of functional human transferrin in stably transfected Drosophila S2 cells.** *Biotechnol Prog* 2004, **20**: 1192-1197.
168. Haltiwanger RS, Lowe JB: **Role of glycosylation in development.** *Annu Rev Biochem* 2004, **73**: 491-537.
169. Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA: **Glycosylation and the immune system.** *Science* 2001, **291**: 2370-2376.
170. Glazier KS, Hake SB, Tobin HM, Chadburn A, Schattner EJ, Denzin LK: **Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO.** *J Exp Med* 2002, **195**: 1063-1069.
171. Khalil H, Deshaies F, Bellemare-Pelletier A, Brunet A, Faubert A, Azar GA *et al.*: **Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells.** *Tissue Antigens* 2002, **60**: 372-382.
172. Haas IG, Wabl MR: **Immunoglobulin heavy chain toxicity in plasma cells is neutralized by fusion to pre-B cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984, **81**: 7185-7188.

173. Masat L, Wabl M, Johnson JP: **A simpler sort of antibody.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 893-896.
174. Hopper JE, Papagiannes E: **Evidence by radioimmunoassay that mitogen-activated human blood mononuclear cells secrete significant amounts of light chain Ig unassociated with heavy chain.** *Cell Immunol* 1986, **101**: 122-131.
175. Novotny J, Haber E: **Structural invariants of antigen binding: comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**: 4592-4596.
176. Ramsland PA, Farrugia W: **Crystal structures of human antibodies: a detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products.** *J Mol Recognit* 2002, **15**: 248-259.
177. Davies DR, Padlan EA, Sheriff S: **Antibody-antigen complexes.** *Annu Rev Biochem* 1990, **59**: 439-473.
178. Sun M, Li L, Gao QS, Paul S: **Antigen recognition by an antibody light chain.** *J Biol Chem* 1994, **269**: 734-738.
179. Painter RG, Sage HJ, Tanford C: **Contributions of heavy and light chains of rabbit immunoglobulin G to antibody activity. I. Binding studies on isolated heavy and light chains.** *Biochemistry* 1972, **11**: 1327-1337.
180. Ledbetter JA, Fell HP, Grosmaire LS, Norris NA, Tsu TT: **An immunoglobulin light chain dimer with CD4 antigen specificity.** *Mol Immunol* 1987, **24**: 1255-1261.
181. Winter G, Milstein C: **Man-made antibodies.** *Nature* 1991, **349**: 293-299.
182. Sutherland R, Buchegger F, Schreyer M, Vacca A, Mach JP: **Penetration and binding of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding fragments in human colon multicellular tumor spheroids.** *Cancer Res* 1987, **47**: 1627-1633.
183. Zocher I, Roschenthaler F, Kirschbaum T, Schable KF, Horlein R, Fleischmann B *et al.*: **Clustered and interspersed gene families in the mouse immunoglobulin kappa locus.** *Eur J Immunol* 1995, **25**: 3326-3331.

184. Marty C, Scheidegger P, Ballmer-Hofer K, Klemenz R, Schwendener RA: **Production of functionalized single-chain Fv antibody fragments binding to the ED-B domain of the B-isoform of fibronectin in *Pichia pastoris*.** *Protein Expr Purif* 2001, **21**: 156-164.
185. Thibodeau J, Lavoie PM, Samaan A, Corre JP, Sekaly RP, Cazenave PA: **Conserved structural features between HLA-DO beta and -DR beta.** *Mol Immunol* 1998, **35**: 885-893.

