

Université de Montréal.

Construction de tétramères de molécules HLA-DR: évidence de la spécificité de la liaison  
du complexe tétramérique au TCR et importance du CD4 dans cette interaction.

Par  
Gaëlle Breton

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

Décembre 2001

©Gaëlle Breton, 2001



W

4

U58

2002

V.054

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Construction de tétramères de molécules HLA-DR: évidence de la spécificité de la liaison  
du complexe tétramérique au TCR et importance du CD4 dans cette interaction.

présenté par:

Gaëlle Breton

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Hugo Soudeyns

président-rapporteur

Dr Daniel Lamarre

membre du jury

Dr Rafick-Pierre Sékaly

directeur de recherche

Mémoire accepté le:

## SOMMAIRE

Les lymphocytes T sont les principaux effecteurs de l'immunité anti-virale à médiation cellulaire. Les cellules T sont subdivisées en deux groupes selon leur fonction effectrice: (a) les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, dits cytotoxiques, tuent les cellules infectées par un virus (b) les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, dits auxiliaires, sécrètent des cytokines qui modulent l'activité des cellules effectrices.

La reconnaissance de l'antigène, présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, par une cellule T CD4<sup>+</sup> est l'étape clef dans l'initiation de la réponse immunitaire dite auxiliaire. Les protéines du CMH de classe II sont des glycoprotéines exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les CPA présentent le peptide antigénique d'origine exogène dans la poche constituée par les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la molécule de CMH de classe II.

Il a été montré que les cellules T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle primordial dans l'initiation et la régulation de la réaction immunitaire anti-virale: une mauvaise activation ou l'absence d'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> est à l'origine d'une persistance virale dans l'organisme.

Afin de détecter, de caractériser et d'évaluer l'importance de la réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> lors d'une infection virale, nous avons développé une nouvelle technologie: les tétramères de CMH de classe II. Les tétramères sont utilisés comme sonde permettant une analyse directe et très précise des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques à un peptide par la technique de cytométrie en flux.

Les tétramères de CMH de classe II générés dans cette étude sont des complexes solubles formés par quatre molécules HLA-DR biotinylées sur la chaîne  $\alpha$  et sur lesquelles sont fixés de façon covalente, au niveau de la chaîne  $\beta$ , différents

peptides. Les peptides choisis (HA<sub>306-318</sub>, TT<sub>830-843</sub>, p65-1<sub>009-023</sub>, p65-2<sub>488-501</sub> et IE1<sub>088-102</sub>) ont tous la propriété de bien se lier aux molécules HLA-DR sélectionnées (HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401). De plus, ils ont un pouvoir immunogénique très fort dans le contexte des ces quatre molécules de CMH de classe II. Il est important de noter que malgré le grand polymorphisme des molécules HLA-DR, les allèles sélectionnés nous permettent de couvrir 70% de la population canadienne et environ 50% de la population mondiale.

La spécificité et la fonctionnalité de l'outil que nous avons produits ont été validées par des expériences de coloration, avec le tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>, d'une lignée cellulaire T CD4<sup>+</sup> spécifique au peptide HA<sub>306-318</sub> et restreinte par la molécule HLA-DR0101.

Nos données prouvent la spécificité des tétramères que nous avons produits et soulignent l'importance du co-récepteur CD4 dans l'interaction tétramère-TCR.

De telles molécules recombinantes sont un atout pour détecter et caractériser la réponse immunitaire impliquant des cellules T CD4<sup>+</sup> mais on peut également envisager de les utiliser dans le cadre d'études fonctionnelles, structurales ou pour moduler la réponse immunitaire T CD4<sup>+</sup>.

# TABLE DES MATIÈRES

PAGE DE TITRE.....	i
PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ANNEXES.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xvi

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

<b>1. L'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.....</b>	<b>1</b>
1.1. Formation du complexe TCR-CMH/peptide.....	1
1.1.1. Aspects biochimiques de l'interaction du TCR avec son ligand....	1
1.1.2. Modèles d'activation de la cellule T.....	5
1.2. La synapse immunologique : dynamique d'activation.....	9
1.3. Signalisation via le complexe CD3.....	12
1.4. Le co-récepteur CD4.....	14
<b>2. Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II .....</b>	<b>15</b>
2.1. Organisation et polymorphisme.....	15
2.1.1. Organisation des gènes du CMH de classe II.....	15
2.1.2. Polymorphisme.....	16
2.1.3. Nomenclature des allèles HLA.....	17
2.2. Fonctions des molécules de CMH de classe II.....	17
2.2.1. Structure.....	17
2.2.2. Stabilité SDS.....	18



<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>59</b>
1. Production, purification et caractérisation biochimique des complexes HLA-DR/peptide.....	59
2. Évidence de la spécificité de la liaison du complexe tétramérique HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> au TCR.....	64
2.1. Liaison spécifique du complexe tétramérique HLA-DR0101/HA sur la lignée cellulaire HA03 et sur le clone T CD4 <sup>+</sup> CH7C17.....	64
2.2. Détection de cellules T CD4 <sup>+</sup> spécifiques de HA <sub>306-318</sub> diluées dans des PBMC avec le tétramère HLA- DR0101/HA <sub>306-318</sub> .....	66
2.3. Corrélation entre la liaison du tétramère HLA- DR0101/HA <sub>306-318</sub> sur la lignée cellulaire HA03 et la fonction effectrice de ces mêmes cellules.....	67
2.4. Détection par tétramère HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> de cellules prolifératives en réponse à une stimulation antigénique avec le peptide HA <sub>306-318</sub> .....	70
2.5. Compétition de l'interaction du tétramère HLA- DR0101/HA <sub>306-318</sub> avec le TCR par des anticorps anti-TCR et anti-CD4.....	71
3. Optimisation des conditions de coloration de la lignée HA03 par le tétramère HLA- DR0101/HA <sub>306-318</sub> .....	73
3.1. Effet de la concentration en tétramère HLA- DR0101/HA <sub>306-318</sub> sur la coloration de la lignée HA03 spécifique de HA <sub>306-318</sub> .....	73
3.2. Cinétique de coloration de la lignée HA03 avec le tétramère HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> .....	73
3.3. Nombre maximum de cellules spécifiques de HA <sub>306-318</sub> détectables par le tétramère HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> .....	77
3.4. Coloration de la lignée HA03 par le tétramère HLA- DR0101/HA <sub>306-318</sub> en fonction de la température.....	79
4. Importance du co-récepteur CD4 dans l'interaction du complexe tétramérique HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> avec le TCR.....	81



<b>DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	84
1. Production des complexes HLA-DR/peptide.....	84
2. Fonctionnalité des tétramères HLA-DR/peptide.....	85
3. Spécificité des molécules HLA-DR/peptide.....	85
4. Rôle du co-récepteur CD4 dans la liaison du tétramère au TCR.....	89
 <b>RÉFÉRENCES</b> .....	 90
 <b>ANNEXES</b> .....	 xvii

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. Paramètres cinétiques de l'interaction du TCR avec son ligand: le complexe CMH/peptide.....	3
TABLEAU 2. Paramètres cinétiques et potentiel d'activation d'oligomères du complexe de CMH de classe II I-Ek/MCC.....	6
TABLEAU 3. Séquences des peptides clonés dans les molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401.....	39
TABLEAU 4. Affinité des peptides HA <sub>306-318</sub> , TT <sub>830-843</sub> , pp65-1 <sub>009-023</sub> , pp65-2 <sub>488-501</sub> et IE1 <sub>088-102</sub> pour les molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401.....	40
TABLEAU 5. Fréquence des allèles des molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401 dans la population canadienne.....	41
TABLEAU 6. Fréquence haplotypique des molécules HLA-DR dans les populations nord américaine et française.....	41
TABLEAU 7. Identification des épitopes de la molécule de CD4 responsables de l'interaction avec les tétramères de CMH de classe II.....	83

## LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE 1.</b> Étapes de formation et structure schématique de la synapse immunologique.....	11
<b>FIGURE 2.</b> Initiation de la cascade de signalisation après engagement du TCR par le complexe CMH/peptide.....	12
<b>FIGURE 3.</b> Organisation génomique de la région HLA-DR du CMH de classe II humain.....	16
<b>FIGURE 4.</b> Structure d'une molécule de CMH de classe II et de la poche peptidique	18
<b>FIGURE 5.</b> Liaisons hydrogène entre le peptide HA <sub>306-318</sub> et la molécule HLA-DR0101.....	22
<b>FIGURE 6.</b> Motif d'apprêtement des peptides ligands du CMH de classe II.....	24
<b>FIGURE 7.</b> Sites de liaison du peptide HA <sub>306-318</sub> à la molécule HLA-DR1.....	25
<b>FIGURE 8.</b> Représentation schématique de tétramères de CMH de classe II et de CMH de classe I.....	31
<b>FIGURE 9.</b> Structure de la molécule de CMH de classe II HLA-DR0101 liant de façon covalente le peptide HA <sub>306-318</sub> .....	35
<b>FIGURE 10.</b> Fonctionnalité de la molécule HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> liant de façon covalente le peptide HA <sub>306-318</sub> .....	36
<b>FIGURE 11.</b> Flexibilité du vecteur eucaryote permettant la production des molécules de HLA-DR/peptide.....	38
<b>FIGURE 12.</b> Taux d'expression de GFP dans les cellules S2 transfectées avec différentes molécules recombinantes HLA-DR/peptide.....	61
<b>FIGURE 13.</b> Corrélation entre le taux de GFP et l'expression en molécules de CMH de classe II.....	61
<b>FIGURE 14.</b> Analyse en Western blot des complexes HLA-DR1501/peptide et HLA-DR0401/peptide.....	62
<b>FIGURE 15.</b> Analyse en Western blot de différents complexes HLA-DR0101.....	63
<b>FIGURE 16.</b> Spécificité de l'interaction tétramère HLA-DR0101/HA avec le TCR..	66

<b>FIGURE 17.</b> Spécificité et limite de détection des tétramères HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> .....	68
<b>FIGURE 18.</b> Relation entre la fonction effectrice de cellules T CD4 <sup>+</sup> spécifiques du peptide HA <sub>306-318</sub> et la liaison du tétramère HLA-DR/HA <sub>306-318</sub> au TCR.....	69
<b>FIGURE 19.</b> Identification par tétramères de cellules HA03 qui prolifèrent en réponse à une stimulation avec le peptide HA <sub>306-318</sub> .....	70
<b>FIGURE 20.</b> Inhibition de la liaison du tétramère HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> au TCR par des anticorps monoclonaux anti-TCR et anti-CD4.....	72
<b>FIGURE 21.</b> Coloration de la lignée CD4 spécifique de HA <sub>306-318</sub> avec des concentrations croissantes de tétramères HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> .....	74
<b>FIGURE 22.</b> Coloration de la lignée HA03 pendant des temps d'incubation variant de une à cinq heures avec une concentration en tétramères de 20µg/ml.....	75
<b>FIGURE 23.</b> Coloration de la lignée HA03 pendant des temps d'incubation variant de une à cinq heures avec une concentration en tétramères de 2µg/ml.....	76
<b>FIGURE 24.</b> Coloration d'un nombre croissant de cellules HA03 avec les tétramères HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> .....	78
<b>FIGURE 25.</b> Effet de la température sur la coloration de la lignée HA03 avec les tétramères HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> .....	80
<b>FIGURE 26.</b> Inhibition de la liaison du tétramère HLA-DR0101/HA <sub>306-318</sub> avec un panel d'anticorps anti-CD4.....	82

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1. Alignement des séquences nucléotidiques des molécules HLA-DRB1*0101, -DRB1*1501, -DRB1*0301 et -DRB1*0401.....	xvii
ANNEXE 2. Alignement des séquences protéiques des molécules HLA-DRB1*0101, -DRB1*1501, -DRB1*0301 et -DRB1*0401.....	xix
ANNEXE 3. Séquence nucléotidique et protéique de la chaîne HLA- BRB1*0101....	xx
ANNEXE 4. Séquence nucléotidique et protéique de la chaîne HLA-DRA*0101....	xxi
ANNEXE 5. Clonage de l'ADNc des chaînes HLA-DR $\alpha$ et -DR $\beta$ .....	xxii
ANNEXE 6. Clonage du peptide HA <sub>306-318</sub> lié de façon covalente à la chaîne HLA-DRB1*0101.....	xxiii
ANNEXE 7. Régions hyper variables des molécules HLA-DRB1*0101, -DRB1*1501, -DRB1*0301 et -DRB1*0401.....	xxiv
ANNEXE 8. Stratégie de clonage.....	xxv
ANNEXE 9. Liste des amorces.....	xxvi
ANNEXE 10. Résidus d'ancrage des peptides HA <sub>306-318</sub> , TT <sub>830-843</sub> , pp65-1 <sub>009-023</sub> , pp65-2 <sub>488-501</sub> et IE1 <sub>088-102</sub> .....	xxvii
ANNEXE 11. Motifs d'ancrage des molécules HLA-DRB1*0101 et HLA-DRB1*1501.....	xxviii
ANNEXE 12. Motifs d'ancrage des molécules HLA-DRB1*0301 et HLA-DRB1*0401.....	xxix

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AICD	Activation Induced Cell Death
APC	Allophycocyanine
ATP	Adénosine Triphosphate
BFA	Brefeldine A
BIA	BIAcore™
BSA	Bovine Serum Albumin
BSP	BirA Substrate Peptide
CD4	Cluster of Differentiation 4
CDR	Complementary Determining Region
CFSE	5-(and-6)-Carboxyfluorescein diacetate, Succinimidyl Ester
CLIP	Class II-associated invariant chain peptide
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
cSMAC	central Supramolecular Activation Clusters
pSMAC	peripheral Supramolecular Activation Clusters
CuSO <sub>4</sub>	Sulfate de cuivre
DAG	Diacylglycerol
°C	Degré celsius
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO <sub>595nm</sub>	Densité Optique à 595nm
EDTA	Disodium Éthylènediaminetétra-acétate dihydrate
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	ELISA Spot
FACS®	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum

FITC	Fluorescein Isothio-Cyanate
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl chemistry
GFP	Green Fluorescent Protein
HA	Hemagglutinine A
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IE1	Immediate-Early phase protein 1
IFN- $\gamma$	Interféron- $\gamma$
IgG $\gamma$	Heavy chain of Immunoglobulin G
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphate
IRES	Internal Ribosome Entry Site
ITAMs	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
kDa	kilodalton
K <sub>D</sub>	Constante d'affinité
K <sub>off</sub>	Constante de dissociation
K <sub>on</sub>	Constante d'association
LAT	Linker for Activation of T cell
LDA	Limiting Dilution Assay
LFA-1	Leucocyte Function-associated Antigen-1
LTR	Long Terminal Repeat
mAb	monoclonal Antibody
min	minutes
MAPK	MAP Kinase
Mg	Magnésium
MCC	Moth Cytochrome C
NaN <sub>3</sub>	Azide de sodium
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
Pb	Paire de bases
PBL	Peripheral Blood Lymphocytes

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoérythrine
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PHA	Phytohémagglutinine A
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKC	Protéine Kinase C
PLC $\gamma$ 1	Phospholipase C gamma 1
RAG	Recombination Activating Genes
rIL-2	recombinant Interleukine-2
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis”
SH2	Src Homology 2
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SLP-76	SH2-domain containing Leukocyte Protein of 76 kD”
SPR	Surface Plasmon Resonance
SS-PCR	Single Strand- Polymerase Chain Reaction
$t_{1/2}$	demi-vie
T=1h	Temps=1 heure
TAP	Transporters associated with Antigen Processing
TCR	T Cell Receptor
Tet	Tétramère
TT	Tetanus Toxoïd
V $\beta$ 3	segment variable n°3 de la chaîne $\beta$ du TCR
VHC	Virus de l’Hépatite C
VIH	Virus de l’Immunodéficience Humaine
V, D, J	Variable, Diversity, and Joining gene segments
Vol	volume
ZAP-70	$\zeta$ -Associated Protein-70



## REMERCIEMENTS

*Je remercie sincèrement le Dr Rafick-Pierre SÉKALY, mon directeur de recherche, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de participer à un projet ambitieux, moderne et stimulant.*

*Je remercie le Dr Bader YASSINE-DIAB, étudiant post-doctoral responsable de ce projet, de m'avoir intégrée dans son équipe et de m'avoir permis de profiter de son expérience, de son enthousiasme, de sa persévérance et de sa patience!!!*

*Je remercie toutes les personnes de l'équipe "tétramère" qui ont participé de près ou de loin au projet: Souheil YOUNES, auteur des Western-blot inclus dans mon mémoire, Léna Kalfayan, Alain Dumont, Younes Chouikh, Eléna Malitskaya, Luc English, Emmanuelle Blanc-Gonnet, Stéphane Hemmerter, et Anne-Elen Kernaleguen.*

*Je remercie le Dr François ERARD de m'avoir donné l'opportunité de venir au Canada poursuivre mes études et d'avoir supervisé mes travaux à mes débuts dans le laboratoire.*

*Je remercie profondément mes collègues pour m'avoir intégrée au laboratoire, pour leur soutien, leur aide et surtout pour tous les bons moments passés ensemble: Laurent Sabbagh, Salah Aouad, Cristina Moldovan, Abdelkader Yachou, Naglaa Shoukry, Marie-Danielle Salha, Helen Mc Grath, Taimour Langae, Sandra Taza, Lina Kozhaya, Nadia Hebib, Geneviève Beaulé, Anne-Elen Kernaleguen, Catherine Riou et Sandrine Crabé.*

# INTRODUCTION

## 1. L'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

L'activation d'une cellule T CD4<sup>+</sup> est initiée par l'interaction du récepteur des cellules T (TCR) avec un complexe CMH/peptide présenté à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA). D'autres protéines participent également à la reconnaissance antigénique par la cellule T CD4<sup>+</sup>: c'est le cas des molécules d'adhésion, des molécules de co-stimulation (comme CD28) et du co-récepteur CD4. Ces interactions moléculaires sont critiques pour l'activation de la cellule T et donc l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire.

Les événements plus en aval sont la formation de la synapse immunologique, l'activation de la cascade de signalisation par le complexe CD3 et l'activation de la transcription permettant la synthèse de cytokines et la prolifération de la cellule T.

### 1.1. Formation du complexe TCR-CMH/peptide

#### 1.1.1. Aspects biochimiques de l'interaction du TCR avec son ligand

Étudier l'interaction TCR-CMH/peptide et en déterminer les constantes cinétiques a été long et laborieux et ce pour deux raisons: (a) le TCR et le CMH sont deux protéines membranaires qu'il a fallu produire sous forme soluble, (b) l'affinité de l'interaction TCR-CMH/peptide étant très faible, seules de nouvelles technologies comme la SPR (Surface Plasmon Resonance) ou BIAcore™ ont permis d'en déterminer les paramètres.

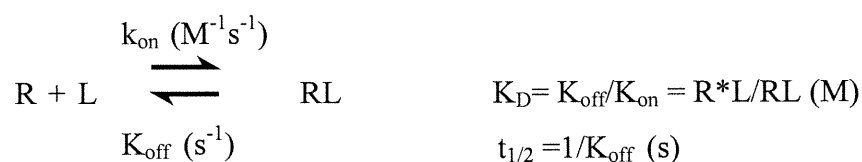
Un des systèmes très utilisé pour la détermination des paramètres cinétiques de l'interaction du TCR avec le complexe CMH de classe II est l'hybridome T 2B4 qui reconnaît le peptide MCC<sub>88-103</sub> (Moth Cytochrome C) présenté dans le contexte de la

molécule de CMH de classe II I-E<sup>k</sup> (1-3). La lignée cellulaire T 5C.C7 possède un TCR similaire en séquence à celui des cellules 2B4: elle est également spécifique au complexe I-E<sup>k</sup>/MCC<sub>88-103</sub> (4,5).

Afin de déterminer les paramètres régissant l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide dans ce système, on a utilisé un panel de peptides altérés qui induisent, chez la cellule T, des réponses biologiques différentes de celles induites par le peptide agoniste comme, par exemple, un profil de cytokines modifié (6) ou l'anergie (7). Une simple modification de la séquence en acides aminés d'un peptide, agoniste pour le TCR, peut faire que ce peptide devienne capable d'inhiber la réponse de la cellule T (peptide antagoniste) ou cause une activation partielle de la cellule T (agoniste partiel) (8,9). Plus la nature de l'acide aminé substitué s'éloigne de l'acide aminé d'origine, plus le peptide passe d'un phénotype d'agoniste partiel à un phénotype d'antagoniste (9). Le peptide MCC(T102S) est muté au niveau d'un des résidus de contact avec le TCR, ce qui réduit son pouvoir prolifératif d'environ 100 fois par rapport au peptide agoniste MCC. Il conserve cependant son potentiel de provoquer l'acidification du milieu. En effet, lors des premières minutes d'activation de la cellule T, il y a une production accrue de métabolites acides comme le lactate: c'est donc un agoniste partiel (4). Le peptide MCC(T102G) est un peptide antagoniste de l'hybridome 2B4: il empêche toute prolifération et, à concentration élevée, toute acidification du milieu (4). Les peptides MCC(K99R) et MCC(K99Q) n'induisent ni la prolifération des cellules 5C.C7 ni l'acidification du milieu: ce sont aussi des peptides antagonistes (5).

#### *Paramètres cinétiques d'interaction protéine-ligand*

A l'équilibre, il y a autant de complexes récepteur/ligand qui se forment que de complexes récepteur/ligand qui se défont. Le  $k_{on}$  et le  $k_{off}$  de la réaction sont équivalents.



*La constante d'affinité ou  $K_D$  (Tableau 1)*

Contrairement aux cellules B, les lymphocytes T ont une faible affinité pour leur ligand: le  $K_D$  de cette interaction est de l'ordre de  $10^{-7}$  à  $10^{-4}$  M (10). L'une des premières mesures de l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide a été réalisée en compétitionnant la liaison d'un anticorps anti-TCR sur le clone T 2B4 spécifique du complexe I-E<sup>k</sup>/MCC par ce même complexe sous forme soluble (1). Le  $K_D$  obtenu est de l'ordre de 50  $\mu$ M.

Cellule T	Peptide	Type	$K_D$ ( $\mu$ M)	$K_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (s)	Méthode	Réf.
2B4	MCC/E <sup>k</sup>	Agoniste fort	50	-	-	-	Comp1	1
2B4	MCC/E <sup>k</sup>	Agoniste fort	30	-	-	-	Comp2	2
2B4	MCC/E <sup>k</sup>	Agoniste fort	90	600	0.057	-	BIA1	2
2B4	MCC/E <sup>k</sup>	Agoniste fort	40	1600	0.063	11	BIA2	3
2B4	PCC/E <sup>k</sup>	Agoniste	80	1105	0.09	8.0	BIA1	2
2B4	MCC(T102S)/E <sup>k</sup>	Agoniste partiel	240	1500	0.36	2.0	BIA2	3
2B4	MCC(T102N)/E <sup>k</sup>	Agoniste partiel	320	1400	0.44	1.6	BIA2	3
2B4	MCC(K99R)/E <sup>k</sup>	Antagoniste	500	9600	4.8	0.15	BIA2	3
2B4	MCC(T102G)/E <sup>k</sup>	Antagoniste	1500	3400	5.1	0.14	BIA2	3
2B4	MCC(T102G)/E <sup>k</sup>	Antagoniste	1050	-	-	-	BIA3	3
2B4	MCC(K99Q)/E <sup>k</sup>	Antagoniste faible	2100	-	-	-	BIA3	3
2B4	MCC(K99Q)/E <sup>k</sup>	Antagoniste faible	-	-	>5.1	-	BIA2	3
5C.C7	MCC/E <sup>k</sup>	Agoniste fort	50	-	-	-	Comp1	3

NB Comp1, compétition avec un anti-TCR  
 Comp2, compétition avec un anti-TCR  
 BIA1, TCR fixé par groupement amine  
 BIA2, TCR fixé par cystéine  
 BIA3, CMH/peptide fixé par groupement amine

**TABLEAU 1.** Paramètres cinétiques de l'interaction du TCR avec son ligand: le complexe CMH/peptide. Comparaison des cinétiques d'interaction du complexe I-E<sup>k</sup> présentant différents peptides (peptide agoniste, agoniste partiel et antagoniste) avec le TCR 2B4.

L'avènement de la technique du BIAcore™ a permis de confirmer et d'affiner ces mesures. Cette technique permet de mesurer l'affinité d'un récepteur pour son ligand. Le principe est de fixer un des composants du complexe récepteur-ligand de façon covalente sur une membrane et de l'exposer à un flux de ligand en solution. Toute variation en concentration protéique est détectée par une méthode optique appelée SPR (11). Matsui *et al.* ont confirmé par cette méthode que l'affinité du TCR 2B4 pour le complexe I-E<sup>k</sup>/cytochrome est de l'ordre de 50μM (2).

#### *La constante de dissociation ou $K_{off}$ (Tableau 1)*

Un des paramètres très important dans la liaison du TCR au complexe CMH/peptide est la constante de dissociation ou le  $K_{off}$ : elle est relativement rapide (0.5 à 0.001s<sup>-1</sup>) (10).

En utilisant différents types de peptides tels que des peptides agoniste, agoniste partiel ou antagoniste et en travaillant avec le modèle 2B4- I-E<sup>k</sup>/cytochrome, Lyons *et al.* ont constaté que l'augmentation du  $K_{off}$  corrèle avec une diminution de l'activité agoniste d'un peptide (3). En d'autres termes, des peptides agonistes partiels ou antagonistes ont un  $K_{off}$  plus élevé que les peptides agonistes. Ils se détachent donc du TCR de façon prématurée ce qui ne permet pas à la cellule d'atteindre un état d'activation complet. L'affinité du peptide antagoniste est de 10 à 50 fois inférieure à celle du peptide agoniste: cette baisse d'affinité est principalement attribuable à l'augmentation du  $K_{off}$ .

#### *La demi-vie ou $t_{1/2}$ de l'interaction TCR-CMH/peptide (Tableau 1)*

La demi-vie représente le  $K_{off}$  du complexe TCR/peptide: en effet c'est l'inverse du  $K_{off}$ . Si le  $K_{off}$  augmente, la demi-vie diminue. Lyons *et al.* ont montré, dans la même étude, que le  $t_{1/2}$  reflète le pouvoir stimuloire d'un peptide: un peptide agoniste a une demi-vie de liaison au TCR plus longue (donc un  $K_{off}$  plus court) que celle d'un peptide agoniste partiel ou antagoniste (4).

### La constante d'association ou $K_{on}$ (Tableau 1)

La constante d'association de l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide peut varier de lente ( $1000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) à modérément rapide ( $200000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (10). Mais elle reste tout de même lente pour une interaction récepteur-ligand.

#### 1.1.2. Modèle d'activation de la cellule T

Avant de présenter les différents modèles d'activation de la cellule T, il est important de récapituler les caractéristiques propres de l'interaction TCR-CMH/peptide:

- C'est une interaction de faible affinité ( $10^{-7}$  à  $10^{-4}$  M) avec une constante de dissociation plutôt rapide ( $t_{1/2}$  entre 2 et 30s) (10).
- On trouve entre  $10^4$  et  $10^5$  molécules de CMH de classe II à la surface d'une cellule présentatrice d'antigènes. Seules 1% de ces molécules de CMH de classe II sont chargées avec le peptide spécifique de la cellule. Mais seulement 10 à 100 complexes CMH/peptide sont nécessaires pour initier l'activation d'une cellule T  $\text{CD4}^+$  (12,13).
- L'activation d'une cellule par un peptide agoniste ou un peptide antagoniste est différente: elle est totale pour un peptide agoniste, alors qu'elle est nulle (voire partielle à faible concentration) pour un peptide antagoniste (4,5,8,9). Un peptide antagoniste diffère essentiellement d'un agoniste au niveau du  $K_{off}$  et donc du  $t_{1/2}$ .
- L'importance de l'oligomérisation du TCR lors de l'activation des cellules T a été suggérée dans différentes études. Boniface *et al.* ont utilisé la technique des tétramères de CMH de classe II pour voir si l'état d'oligomérisation du complexe CMH-peptide avait une importance pour l'activation des cellules T (Tableau 2). Ils ont montré que plus le complexe CMH-peptide a un fort degré d'oligomérisation, plus il a le pouvoir de stimuler les cellules T (l'activation de la cellule T est évaluée par mesure du flux calcique intracellulaire, le calcium étant un second messenger important de la cascade de signalisation). Ceci s'explique par un  $t_{1/2}$  nettement plus élevé pour un complexe tétramérique que pour un complexe monomérique. Il en est de même pour un agoniste partiel qui

même sous forme tétramérique active faiblement les cellules T (14). Cochran *et al.* ont montré, en utilisant des complexes CMH/peptide solubles, qu'un dimère de CMH/peptide est nécessaire et suffisant pour induire l'activation de la cellule T, en l'occurrence l'internalisation du complexe CD3 et l'apparition des récepteurs CD69 et CD25. En effet un monomère CMH/peptide se liera au TCR mais n'induit pas d'activation (15).

Cellule T	Peptide	Type	$t_{1/2}$ (s)	Méthode	Réf.
2B4	MCC E <sup>k</sup>	Agoniste fort	11	BIA	2
2B4	MCC E <sup>k</sup> monomère	Agoniste fort	14	BIA	13
2B4	MCC E <sup>k</sup> dimère	Agoniste fort	204	BIA	13
2B4	MCC E <sup>k</sup> trimère	Agoniste fort	1020	BIA	13
2B4	MCC E <sup>k</sup> tétramère	Agoniste fort	1920	BIA	13
2B4	MCC(T102S) E <sup>k</sup>	Agoniste partiel	1.5	BIA	13
2B4	MCC(T102S) E <sup>k</sup> tétramère	Agoniste partiel	144	BIA	13

Cellule T	Peptide	Type	% de cellules activées déterminé par mesure du flux calcique		Réf.
			entière	partiellement	
5C.C7	MCC/APC	Agoniste fort	90-95%		13
5C.C7	MCC(T102S)/APC	Agoniste partiel	80-95%		13
5C.C7	MCC E <sup>k</sup>	Agoniste fort			13
5C.C7	MCC E <sup>k</sup> monomère	Agoniste fort			13
5C.C7	MCC E <sup>k</sup> dimère	Agoniste fort			13
5C.C7	MCC E <sup>k</sup> tétramère	Agoniste fort		77%	13
5C.C7	MCC(T102S) E <sup>k</sup>	Agoniste partiel			13
5C.C7	MCC(T102S) E <sup>k</sup> tétramère	Agoniste partiel			13

**TABLEAU 2.** Paramètres cinétiques et potentiel d'activation d'oligomères du complexe de CMH de classe II I-E<sup>k</sup>/MCC.

#### *Le "serial triggering model"*

Un unique complexe CMH/peptide peut engager jusqu'à une centaine de TCR lors de l'interaction d'une cellule T avec une CPA (16-18). L'engagement du TCR

pendant un laps de temps suffisant amorce le début de la cascade de signalisation. Puis le TCR engagé se dissocie du complexe de CMH de classe II et est internalisé. La molécule de CMH de classe II libérée peut engager un nouveau TCR. Viola *et al.* ont montré qu'une cellule T est activée quand un minimum de 8000 TCR sont engagés par des complexes CMH/peptide (19). Ce modèle est en accord avec le fait que (a) quelques complexes CMH/peptide sont suffisants à induire l'activation de la cellule T (b) l'interaction TCR-CMH/peptide soit de faible affinité et de  $K_{off}$  rapide ce qui permet à une molécule de CMH/peptide de se libérer rapidement pour pouvoir aller engager un nouveau TCR (c) un peptide agoniste partiel ou antagoniste, qui a un  $t_{1/2}$  trop bref, résulte en une activation partielle du TCR. Par contre, ce modèle est basé sur la mesure de l'internalisation du TCR, paramètre qui s'est révélé mauvais à utiliser. En effet, deux études ont montré que le TCR pouvait être internalisé alors qu'il n'a pas été engagé par un complexe CMH/peptide (20,21). Donc sur les 8000 TCR qui sont internalisés lors de l'activation de la cellule T, tous n'ont pas forcément interagi avec le complexe CMH/peptide.

#### *Le "kinetic model" de l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide*

Ce modèle suggère qu'une faible différence dans l'affinité du TCR pour différents ligands et donc dans la durée de l'interaction TCR-CMH/peptide se traduit par une différence dans l'activation de la cellule T. Un peptide agoniste partiel ou antagoniste, qui a un  $t_{1/2}$  légèrement plus faible pour le TCR que le peptide agoniste, stimule le TCR mais de façon trop brève pour maintenir la cascade de signalisation et générer un signal complet.

Il existe plusieurs variantes de ce modèle:

- le "*kinetic proofreading model*"(22): Le signal transmis par le TCR s'atténue à chaque étape de la cascade de signalisation. Il faut donc que le TCR interagisse avec le complexe CMH/peptide un minimum de temps pour que le signal progresse jusqu'à la fin de la cascade de signalisation.
- le "*kinetic discrimination model*"(23): c'est un modèle qui dépend fortement du  $K_{off}$  du ligand pour son récepteur. Un ligand qui se lie suffisamment longtemps à



son récepteur va induire un signal positif contrairement à un ligand qui se décroche rapidement de son récepteur et qui induit un signal négatif. La réponse de la cellule T dépend du ratio de signaux complets ou positifs qu'elle a reçu par rapport aux signaux incomplets ou négatifs.

- le "*optimal dwell time/serial triggering model*"(24): Kalergis *et al.* ont montré que l'activation d'une cellule T est efficace quand l'interaction TCR-CMH/peptide se déroule dans une fenêtre de  $t_{1/2}$  ni trop court (pour que le TCR induise la cascade de signalisation), ni trop long (pour pouvoir engager suffisamment de TCR). Mais ce modèle n'explique pas comment des peptides altérés, qui ont des  $t_{1/2}$  similaires au peptide agoniste, peuvent induire une réponse totalement différente au niveau de la cellule T (25).

#### Le "*receptor clustering/multimerization model*"

Suite à l'interaction du TCR, les complexes TCR-CMH/peptide dimérisent (26) ou oligomérisent (27,28). Cela crée une proximité des molécules impliquées dans la signalisation via le complexe CD3. Ce modèle est en contradiction avec le modèle de "serial triggering" qui propose que l'engagement du TCR a lieu à une faible concentration en complexes CMH/peptide.

Une variante de ce modèle est le "*raft association model*" qui suggère que les TCR seraient concentrés au niveau de microdomaines riches en lipides ce qui favoriserait leur oligomérisation (29,30). Il a été montré que des molécules de CMH de classe II de lymphocytes B étaient également regroupées dans des microdomaines et que la désorganisation de ces domaines est néfaste pour la présentation antigénique (31). De plus certaines molécules impliquées dans la cascade de signalisation se retrouvent également au niveau de ces microdomaines. Mais Baker *et al.* n'ont pas réussi à mettre en évidence l'oligomérisation du TCR bien qu'ils utilisent des protéines solubles comme dans les études précédentes (26-28). Ils suggèrent que l'oligomérisation du TCR devrait être étudiée sur des protéines membranaires et non solubles (32).

### Le “*conformational change model*”

Après la liaison d'un complexe CMH-peptide, le TCR subit des changements conformationnels qui sont transmis, via le complexe CD3, à la machinerie de signalisation intracellulaire. Ce modèle est contredit par plusieurs études qui n'ont pas constaté de différences conformationnelles du TCR qu'il soit lié ou non à un complexe CMH/peptide ou qu'il interagisse avec un peptide agoniste versus un peptide antagoniste (33-35).

### Le “*occupancy model*”

Le potentiel d'un ligand d'activer une cellule T dépend de son affinité pour le TCR et de sa concentration. La dose de l'antigène est en corrélation directe avec l'importance de la réponse de la cellule T mais aussi avec la qualité de la réponse: une cellule T activée avec une dose élevée d'antigène a un profil de cytokines qui est plus large que celui d'une cellule activée avec une faible dose d'antigène (36,37). Toutefois, on peut cependant se demander si l'importance de la dose de l'antigène peut se définir comme un modèle à part entière ou si c'est un paramètre qu'il faudrait inclure dans tous les modèles de l'activation d'une cellule T.

## 1.2. La synapse immunologique: dynamique d'activation

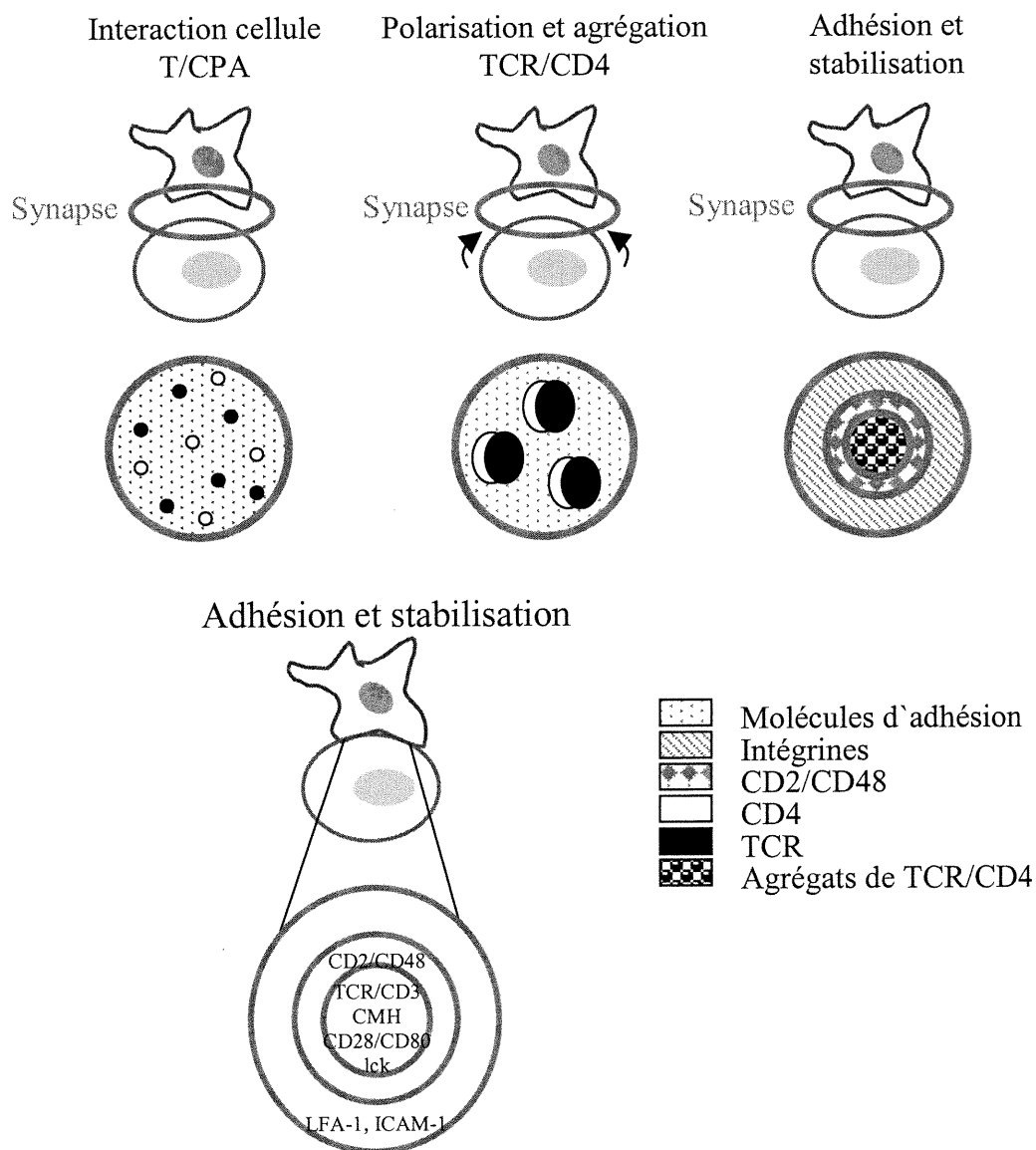
L'activation d'une cellule T nécessite l'interaction du TCR avec un complexe CMH/peptide: la zone de contact entre la cellule T et la CPA est appelée synapse immunologique. La synapse immunologique se forme en plusieurs étapes qu'il a été possible de définir grâce aux études faites sur des cellules vivantes par des techniques de microscopie à fluorescence (Figure 1):

- (a) Le premier évènement dans la formation de la synapse immunologique est la *polarisation de la cellule T*. Les cellules T circulant dans le sang périphérique sont très mobiles et ont une morphologie ronde (38). Lorsqu'elles sont amenées à rencontrer l'antigène au niveau des organes lymphoïdes secondaires, elles

s'immobilisent et subissent des changements morphologiques (38,39). Les chémokines présentes au site d'interaction de la cellule T et de la CPA induisent, via les récepteurs à chémokines, la polymérisation de l'actine à un des pôles de la cellule T (40,41). Il y a alors une redistribution des molécules à la surface de la cellule T: des glycoprotéines telles que CD43 et CD45 sont exclues de la synapse immunologique (42-44). En effet ces protéines, dont la taille est de 50 nm, ne permettraient pas l'interaction du TCR avec son ligand le complexe de CMH de classe II (la taille du complexe TCR-CMH/peptide étant de 14nm) (45,46).

- (b) A cause de la faible affinité du complexe CMH/peptide pour le TCR et malgré l'accumulation de protéines de CMH de classe II au niveau de la synapse, il faut que d'autres récepteurs tels que des intégrines (LFA-1 [leucocyte function-associated antigen-1] et ICAM-1 [intercellular adhesion molecule]) et des molécules de type immunoglobuline (CD2 et CD48) interviennent pour maintenir une *adhésion* suffisante de la cellule T et de la CPA (47). Ces récepteurs d'adhésion forment une couronne interne ou centrale appelée cSMAC (central supramolecular activation clusters) (48). Le complexe LFA-1 et son ligand ICAM-1 (40nm) initie l'adhésion de la cellule T et de la CPA. Le complexe CD2/CD48 (14nm comme le complexe TCR-CMH/peptide) facilite la formation d'une zone de contact très étroite qui favorise l'interaction du TCR et de son ligand, c'est-à-dire le complexe CMH/peptide. Tout ceci se passe en quelques secondes (10-30s) (48). On retrouve également le co-récepteur CD4 et la molécule de costimulation CD28 au niveau de la cSMAC (30,49,50).
- (c) Lors des dix minutes suivantes, les molécules de CMH de classe II qui se sont accumulées à la périphérie migrent vers le centre de la synapse. Les molécules ICAM-1 et CD2 sont relocalisées au niveau de la pSMAC (peripheral supramolecular activation clusters) (48). Il y a alors *stabilisation* de la synapse ce qui permet l'engagement du TCR par le complexe CMH/peptide.
- (d) Il y a ensuite initiation de la cascade de *signalisation* via le complexe TCR/CD3.
- (e) La synapse immunologique peut se maintenir pendant des heures et des heures (48): son *maintien* est favorisé par le recrutement de nombreux microdomaines riches en glycolipides. Il a notamment été montré qu'il y a une forte

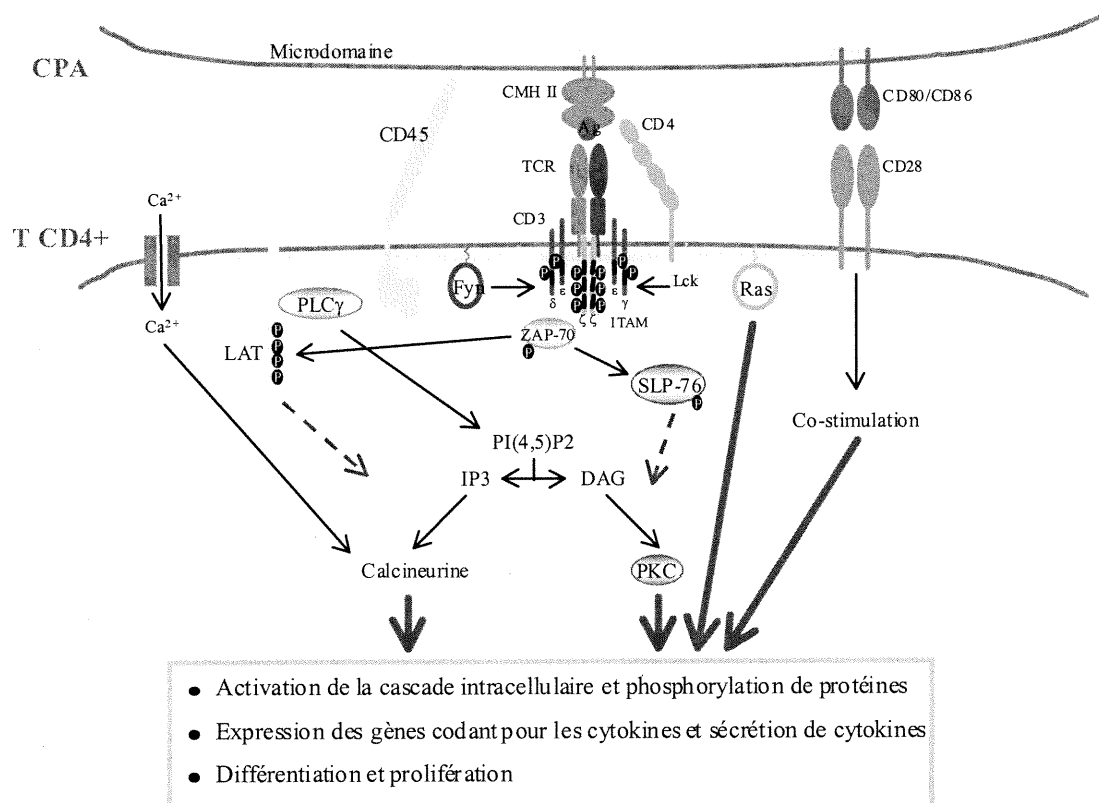
- (a) accumulation au niveau de ces microdomaines, suite à l'engagement du TCR, des molécules impliquées dans l'activation de la cellule T comme les protéines CD4, CD28 et lck (30,49-51).
- (b) La synapse immunologique *se termine* au bout de 24-48 heures (48). Pour une cellule, la capacité de maintenir la synapse immunologique dépend du nombre de molécules de CMH de classe II engagées et de l'organisation de la synapse (présence de microdomaines ou non...).



**FIGURE 1.** Étapes de formation de la synapse immunologique. D'après Van der Merwe *et al.* 2000. *Seminars in Immunology*. 12:5-21 (52).

### 1.3. Signalisation via le complexe CD3

L'interaction d'un TCR avec un complexe CMH/peptide va causer toute une série d'évènements activant la cascade de signalisation et menant ultimement à la prolifération cellulaire, la production de cytokines voire même à la mort cellulaire (Figure 2).



**FIGURE 2.** Initiation de la cascade de signalisation après engagement du TCR par le complexe CMH/peptide. D'après Leo et Schraven. 2001. *Curr. Opin. Immunol.* 13:307-316 (53).

Alors que le TCR est chargé de la reconnaissance antigénique, c'est le complexe CD3 qui est responsable de la signalisation. Le complexe CD3 est composé de cinq sous-unités: une chaîne CD3- $\gamma$ , une chaîne CD3- $\delta$ , une chaîne CD3- $\epsilon$  et deux

chaines CD3- $\zeta$  (54). Les chaines du complexe CD3 n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque. La signalisation se fait via des protéines tyrosine-kinase qui se lient aux chaines du complexe CD3 sur des motifs consensus: les séquences ITAM (Immunorécepteur Tyrosine-based Activation Motif) dont le motif consensus  $Y_{XX}(L/I)_{X(6-8)}Y_{XX}(L/I)$  est exprimé en un exemplaire sur le domaine cytoplasmique des chaines CD3- $\gamma$ , - $\delta$ , et - $\epsilon$  et en trois exemplaires sur le domaine cytoplasmique des chaines  $\zeta$  (55). Suite à l'engagement du TCR, les kinases  $p56^{lck}$  (qui est associée au co-récepteur CD4) et  $p59^{fyn}$  sont recrutées et activées (56-58). Ces kinases sont responsables de la phosphorylation des ITAM des chaines du complexe CD3 (58,59). Les ITAM phosphorylés recrutent des protéines contenant des motifs SH2 (src homology 2) qui sont impliquées dans les événements plus en aval dans la cascade de signalisation: c'est le cas de la protéine ZAP-70 ( $\zeta$ -associated protein-70) (60). ZAP-70 est activée suite à sa phosphorylation par la protéine  $p56^{lck}$  (61). La kinase ZAP-70 active phosphoryle à son tour des substrats majeurs comme LAT (linker for activation of cell) et SLP-76 (SH2-domain containing leucocyte protein) et initie les événements clef de la cascade de signalisation (62,63):

- phosphorylation et activation de la phospholipase C gamma 1 (PLC $\gamma$ 1) qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) et génère les substrats inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG) qui induisent, respectivement, une élévation de la concentration intracellulaire en calcium et l'activation de la protéine kinase C (PKC). La hausse du calcium intracellulaire active la phosphatase calcineurine qui déphosphoryle et active le facteur de transcription **NF-AT** (nuclear factor of activated T cells). La PKC, quant à elle, active le facteur de transcription **NF $\kappa$ B** (nuclear factor  $\kappa$ B) (64).
- ZAP-70 active la GTPase Ras. Celle-ci induit une cascade de protéines kinase, comme les MAPK (MAP kinase), qui aboutit à la production du facteur de transcription **AP-1** (65).

Les facteurs de transcription NF-AT, NF $\kappa$ B et AP-1 initient la transcription de gènes qui sont responsables de la différenciation et de la prolifération des cellules T (66).

#### 1.4. Le co-récepteur CD4

Le co-récepteur CD4 est exprimé à la surface des cellules T CD4<sup>+</sup> et permet de distinguer ces cellules d'un autre sous-type de cellules T: les cellules T CD8<sup>+</sup>. Le co-récepteur CD4 interagit avec une région non-polymorphique de la protéine de CMH de classe II et joue un rôle important dans le développement et l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> (67).

La molécule CD4 est une glycoprotéine de membrane de 55 kDa qui possède quatre domaines extracellulaires de type immunoglobuline (D1-D4). Les domaines D1 et D2, situés en N-terminal, interagissent avec le domaine  $\beta$ 2 de la molécule de CMH de classe II (68-69) alors que les domaines D3 et D4 jouent un rôle dans la dimérisation du co-récepteur CD4: la structure cristallographique du co-récepteur CD4 a en effet montré l'existence de dimères à une forte concentration protéique (70). Le domaine cytoplasmique de la protéine CD4 possède un motif cystéine qui permet l'association non covalente du co-récepteur CD4 et de la Protéine Tyrosine Kinase (PTK) intracellulaire p56<sup>lck</sup> (71). La protéine p56<sup>lck</sup> est impliquée dans l'initiation de la cascade de signalisation après engagement du TCR (72). L'affinité du co-récepteur CD4 pour son ligand est très faible: elle est de l'ordre de  $10^{-2}$  M.

Le co-récepteur CD4 pourrait avoir deux fonctions: (a) stabiliser l'interaction du complexe TCR-CMH/peptide puisque le CD4 interagit avec le TCR et avec la molécule de CMH classe II en des zones différentes (b) et/ou participer au recrutement de protéines impliquées dans la cascade de signalisation du TCR telles que la PTK p56<sup>lck</sup>, ce recrutement n'étant possible que quand le complexe TCR-CMH/peptide est stable.

Des études récentes, utilisant des complexes CMH/peptide multivalents, ont montré que le co-récepteur CD4 ne contribue pas à la liaison du complexe CMH/peptide au TCR (14,73,74). Le rôle que pouvait avoir le co-récepteur CD4 dans l'interaction TCR-CMH/peptide agoniste versus TCR-CMH/peptide antagoniste a également été étudié (75,76): le co-récepteur CD4 augmente la réponse de la cellule T dans le cas d'un peptide agoniste et d'un peptide agoniste partiel mais pas dans le cas d'un peptide antagoniste. Ces études semblent indiquer qu'une interaction stable TCR-

CMH/peptide, induite par un peptide agoniste, est nécessaire pour le recrutement du co-récepteur CD4. Ce ne serait donc pas le co-récepteur CD4 qui stabiliserait le complexe TCR-CMH/peptide. De plus Boniface *et al.* ont montré que le CD4 était critique pour les évènements précoces de l'activation d'une cellule T comme l'acidification du milieu induite par un multimère CMH/peptide mais pas pour les évènements plus tardifs tel que le flux de calcium intracellulaire (14).

## 2. Le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

### 2.1. Organisation et polymorphisme

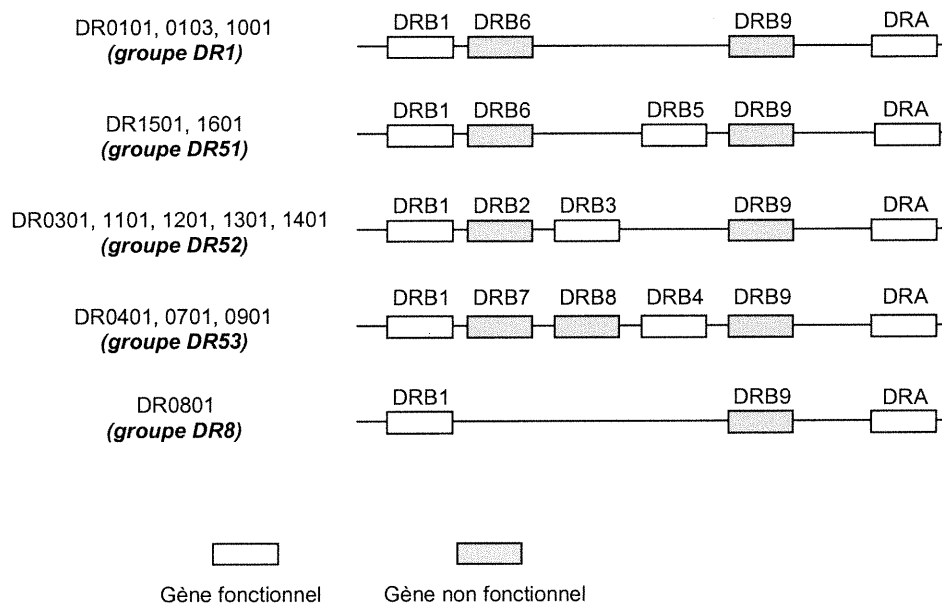
#### 2.1.1. Organisation des gènes du CMH de classe II

Le complexe majeur d'histocompatibilité humain est constitué d'une série de gènes très polymorphes, tous situés sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3). La région se situant le plus près du centromère correspond au locus des gènes du CMH de classe II. Il existe trois isoformes de molécules de CMH de classe II exprimés sur les CPA humaines: HLA-DP, -DQ et -DR. Cette région code également pour la molécule HLA-DO et pour certaines des molécules impliquées dans l'apprêtement des peptides (TAP, LMP, HLA-DM) (77).

Chacun des loci codant pour les molécules HLA-DQ et -DP contient deux gènes: un codant pour la chaîne  $\alpha$  [HLA-DQA1(20 allèles) et HLA-DPA1(18 allèles)] , l'autre codant pour la chaîne  $\beta$  [HLA-DQB1(45 allèles) et HLA-DPB1(88 allèles)]. L'organisation des gènes HLA-DR est plus complexe: il existe un gène codant pour la chaîne  $\alpha$  [HLA-DRA (2 allèles)] et neuf gènes codant pour la chaîne  $\beta$  [HLA-DRB1(238 allèles),-DRB2 (1 allèle), -DRB3 (28 allèles), -DRB4(9 allèles), -DRB5 (14 allèles), -DRB6 (3 allèles), -DRB7(2 allèles),-DRB8 (1 allèle), -DRB9 (1 allèle)]. Parmi ces neuf gènes, seuls les gènes HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 et -DRB5 sont fonctionnels.



Ces différents gènes sont regroupés en cinq haplotypes: chaque haplotype code pour les gènes DRB1 et DRA; certains haplotypes codent pour un autre gène fonctionnel. Les haplotypes DR1 et DR8 codent pour un type unique de molécules HLA-DR alors que les haplotypes DR51, DR52 et DR53 codent pour deux types de molécules HLA-DR (Figure 3).



**FIGURE 3.** Organisation génomique de la région HLA-DR du CMH de classe II humain. Ce schéma représente le polymorphisme haplotypique de la région HLA-DR. Le locus DR code pour une chaîne  $\alpha$  monomorphe et pour une chaîne ou deux chaînes  $\beta$  suivant l'haplotype. Cette variabilité dans le nombre de loci DRB (ou variation isotypique) peut induire l'expression de différentes molécules DR à la surface de la cellule. Les gènes exprimés sont indiqués en blanc et les pseudogènes en gris.

### 2.1.2. Polymorphisme

Comme mentionné plus haut, les gènes du CMH de classe II existent sous de très nombreuses formes alléliques. Les différences entre deux formes alléliques peuvent

porter sur une vingtaine d'acides aminés. Ce sont les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  (domaines qui constituent la poche peptidique) qui sont les plus polymorphes: les différences d'un allèle à l'autre sont principalement localisées au fond de la poche peptidique et sur les hélices  $\alpha$  qui bordent cette poche. Pour la molécule HLA-DR, seule la chaîne  $\beta$  est polymorphe. En effet la chaîne  $\alpha$  est quasi monomorphe: il existe qu'un seul résidu polymorphe (Leu/Val en position 217) situé au niveau du domaine cytoplasmique et qui n'a donc aucune influence sur la liaison du peptide.

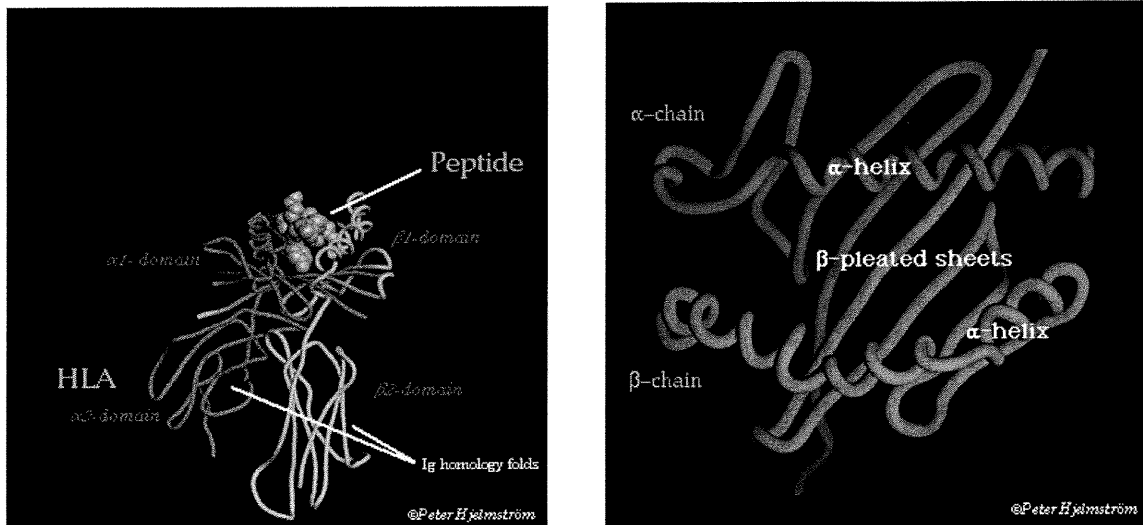
### 2.1.3. Nomenclature des allèles HLA

Pour les molécules de CMH de classe II DP et DQ, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  étant polymorphiques, il est nécessaire de préciser le locus et l'allèle de chacune des deux chaînes: par exemple HLA-DQ (A1\*0501, B1\*0201). Pour les molécules DR, seule la chaîne  $\beta$  est polymorphe, on ne nomme donc pas la chaîne  $\alpha$ ; on écrira donc par exemple HLA-DRB1\*0302 (et non HLA-DR [A1\*0101, B1\*0302]).

## 2.2. Structure et fonction des molécules de CMH de classe II

### 2.2.1. Structure

Les molécules de CMH de classe II sont des glycoprotéines membranaires hétérodimériques constituées d'une chaîne  $\alpha$  d'environ 33 kDa et d'une chaîne  $\beta$  d'environ 29 kDa. Chacune des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  est formée d'un domaine cytoplasmique court, d'une portion transmembranaire et de deux domaines extracellulaires (respectivement  $\alpha 1/\alpha 2$  et  $\beta 1/\beta 2$ ) qui ont une structure similaire à celle du domaine constant des immunoglobulines. Le domaine  $\beta 1$  est le plus polymorphe. Les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  délimitent la poche où vient se loger le peptide antigénique. L'interaction entre les deux chaînes se fait par l'intermédiaire de liaisons non covalentes (Figure 4) (78).



**FIGURE 4.** Structure d'une molécule de CMH de classe II et de la poche peptidique. La molécule de CMH de classe II est une glycoprotéine de membrane constituée d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ . Les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  de chacune des deux chaînes délimitent la poche peptidique. Tiré de Peter Hjelmström (<http://depts.washington.edu/rhwlab/dq/3structure.html>).

### 2.2.2. Stabilité SDS

Les molécules de CMH de classe II peuvent adopter deux conformations différentes qui peuvent être distinguées par leur stabilité en gel SDS dans des conditions non dénaturantes: la forme compacte migre à une hauteur de 56 kDa alors que la forme relaxée migre à la hauteur de 65 kDa. La forme relaxée résulte de la dénaturation partielle de la forme compacte, celle-ci correspondant à la molécule de CMH de classe II qui est correctement repliée et ceci grâce à la liaison du peptide dans la poche peptidique. Si la molécule de CMH de classe II apparaît sous la forme compacte, c'est qu'il y a un peptide dans la poche peptidique. Cependant la liaison du peptide sur la molécule de CMH de classe II ne lui assure pas toujours d'être SDS stable (79,80). Dans le cas de la molécule HLA-DR0101 et du peptide HA<sub>306-318</sub>, une mutation dans la poche d'ancrage P1 peut abolir la stabilité SDS. En effet, ce complexe n'est SDS stable que lorsque la poche P1 hydrophobe est occupée par un

acide aminé aromatique (Trp, Phe, Tyr) ou un acide aminé aliphatique (Met, Ile, Val, Leu) (81).

### 2.2.3. Dimérisation

La structure cristallographique de la molécule HLA-DR1 a montré que les molécules de CMH de classe II existent sous forme de dimères de dimères aussi appelés superdimères (82). D'autres études suggèrent l'existence de tels superdimères:

- Les structures cristallographiques des récepteurs impliqués dans la reconnaissance antigénique, comme le domaine V $\alpha$  du TCR (83) et le co-récepteur CD4 (70), ont révélé des associations homodimériques.
- Des mutations au niveau des résidus situés dans l'interface d'interaction de deux molécules de CMH de classe II inhibent la présentation antigénique (84,85).
- Isolation de molécules HLA-DR de 120 kDa, correspondant à la forme superdimérique de la molécule de CMH de classe II, par immunoprécipitation et western blot (86).
- Détection de superdimères HLA-DR par "single particle fluorescent imaging" (87).
- Un complexe CMH/peptide monomérique se lie au TCR mais n'induit pas l'activation de la cellule T alors que la forme dimérique en est capable (14,15).

L'interaction d'un dimère de TCR avec un dimère de CMH de classe II augmenterait l'avidité de la liaison TCR-CMH/peptide et par conséquent permettrait une activation totale déclenchant la cascade de signalisation. On ignore encore si la formation de ces superdimères a lieu après engagement du TCR ou bien s'ils existent de façon naturelle à la surface des cellules.

### 2.2.4. Localisation, nombre de molécules exprimées

#### *Localisation*

Les molécules de CMH de classe II sont exprimées seulement sur les CPA au sens strict (lymphocytes B, macrophages/monocytes et cellules dendritiques) et sur les

cellules T activées. Leur expression est modulée, entre autres, par l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et le TNF- $\alpha$  (88).

#### *Nombre de molécules exprimées par cellules*

La transmission des gènes du CMH se fait selon la loi de la génétique classique, les gènes, codant pour un haplotype, étant transmis en bloc. L'expression étant co-dominante, un individu hétérozygote exprime à la fois les molécules codées par l'haplotype maternel et l'haplotype paternel. Il peut donc avoir jusqu'à 8 molécules de CMH de classe II différentes: deux molécules DQ, deux molécules DP et quatre molécules DR.

Une cellule B exprime à sa surface environ  $10^4$ - $10^6$  molécules de CMH de classe II (12,13).

#### 2.2.5. Apprêtement et présentation des antigènes

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la molécule de CMH de classe II sont synthétisées et s'assemblent dans le réticulum endoplasmique rugueux. Une fois la molécule de CMH de classe II formée, la chaîne invariante (Ii) bloque, temporairement, la poche peptidique pour éviter que tout peptide puisse s'y fixer: il se forme alors un complexe nonamérique  $(\alpha\beta)_3Ii_3$  (89). La chaîne invariante a également comme rôle de diriger le complexe CMH de classe II-Ii vers le compartiment endosomal (90). La chaîne invariante est ensuite dégradée séquentiellement par des protéases comme les cathepsines (91). Il reste alors sur la molécule de CMH de classe II des petits fragments dérivés de la chaîne invariante qui sont appelés CLIP (class II-associated invariant chain peptides) (97). C'est la molécule HLA-DM, une molécule HLA non classique et relativement polymorphe, qui s'assure d'éliminer les peptides CLIP de la poche peptidique afin de la charger avec un peptide antigénique (92). En fait la molécule HLA-DM agit comme une molécule chaperonne qui se fixe sur le complexe CMH de classe II-Ii, complexe relativement instable, afin de le stabiliser. HLA-DM ne se décroche de la molécule de CMH de classe II que lorsqu'un peptide s'y fixe, lui assurant ainsi une grande stabilité. La molécule HLA-DO s'associe à la

molécule HLA-DM dans le réticulum endoplasmique et fonctionne comme un inhibiteur de son activité (93). L'inhibition de l'activité de la molécule HLA-DM par la molécule HLA-DO module le répertoire antigénique en empêchant la présentation de certains peptides et en favorisant la présentation d'autres peptides (94). Les molécules de CMH de classe II stables sont alors transportées à la surface de la cellule.

### 2.3. Interaction CMH de classe II/peptide

Toutes les données qui vont être présentées ici sont essentiellement basées sur les molécules HLA-DR car elles sont tirées des structures cristallographiques des molécules HLA-DR0101(82,95), HLA-DR1501(96), HLA-DR0301(97) et HLA-DR0401 (98).

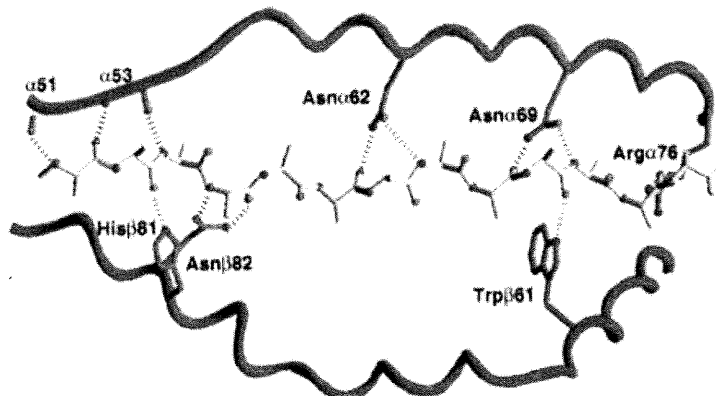
#### 2.3.1. Caractéristiques de la liaison du peptide au CMH de classe II

##### 2.3.1.1. Interactions spécifiques et non spécifiques

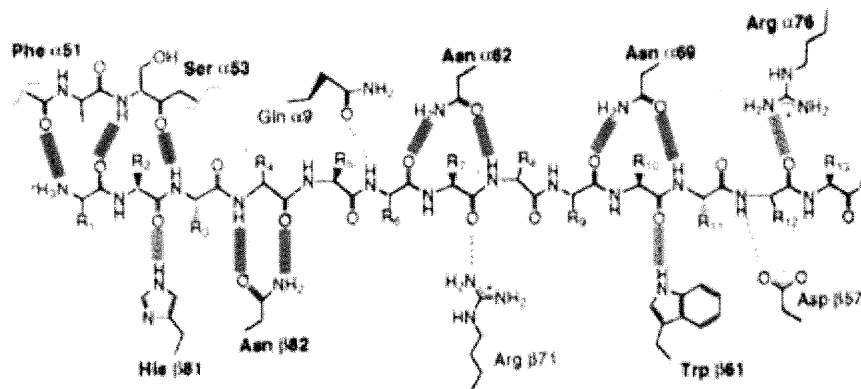
Les interactions du peptide dans la poche peptidique sont de deux types (95):

- Des interactions "non spécifiques" de type liaison hydrogène entre les résidus non polymorphes de la molécule de CMH de classe II et la chaîne principale du peptide. Par exemple, il existe 15 liaisons hydrogène entre le peptide HA<sub>306-318</sub> et la molécule HLA-DR0101 dont douze impliquent des résidus conservés dans toutes les molécules de CMH de classe II. Le fait que des liaisons hydrogènes soient identiques d'une molécule HLA-DR à une autre induit une conformation similaire pour tous les peptides logés dans la poche peptidique (Figure 5).
- Des interactions "spécifiques" entre les résidus polymorphes de la molécule de CMH de classe II et les chaînes latérales des résidus du peptide. Les résidus polymorphes se situent principalement dans ce qui constitue le plancher et les bords de la poche peptidique (§2.3.1.5).

A



B



**FIGURE 5.** *Liaisons hydrogène entre le peptide HA<sub>306-318</sub> et la molécule HLA-DR0101.* Vue 3D (A). Vue 2D (B). Tiré de Stern *et al.* 1994. Nature. 368:215-221 (95).

### 2.3.1.2. Poche peptidique, poches d'ancrage et résidus d'ancrage

La *poche peptidique* est formée par les domaines membranaires distaux à la fois de la chaîne  $\alpha$  (domaine  $\alpha 1$ ) et de la chaîne  $\beta$  (domaine  $\beta 1$ ), chacun étant constitué d'une hélice  $\alpha$  et de quatre feuillets  $\beta$  (Figure 4). Les feuillets  $\beta$  de la chaîne  $\alpha$  et de la chaîne  $\beta$  constituent le plancher de la poche peptidique et les hélices  $\alpha$  de chacune des deux chaînes en constituent les bords. La poche peptidique possède neuf points d'ancrage pour le peptide (P1-P9). Le sillon délimité par les deux hélices est, comme

mentionné précédemment, ouvert en son extrémité. La poche peptidique peut donc recevoir des peptides de longueur variable (typiquement entre 12 et 24 résidus).

Les *poches d'ancrage* sont au nombre de quatre. Elles acceptent un certain type d'acides aminés et déterminent donc un motif peptidique spécifique et permettant la fixation à la molécule de CMH de classe II.

Les *résidus d'ancrage* sont de trois types: (a) les résidus d'ancrage *obligatoires*, comme dans le cas des molécules HLA-DR0101 et -DR0401 où la poche P1 n'accepte que des résidus aromatiques hydrophobes à défaut de quoi l'affinité de la molécule de CMH de classe II pour le peptide est très fortement diminuée, (b) les résidus d'ancrage *auxiliaires*, qui ont plus un rôle dans le positionnement du peptide dans le sillon peptidique mais dont la mutation affecte également la liaison du peptide: c'est le cas pour la poche P4 de la molécule HLA-DR0101, (c) les résidus d'ancrage qui reflètent les contraintes stériques de la poche d'ancrage : dans le cas où une alanine ou une glycine sont recommandées, un résidu avec une chaîne latérale encombrante diminuera l'affinité de la liaison du peptide au complexe CMH de classe II.

### 2.3.1.3. Taille et conformation du peptide

#### *Taille du peptide:*

La poche peptidique étant ouverte à chacune de ces deux extrémités, les peptides pouvant se lier sur une molécule de CMH de classe II ont des longueurs variables allant de 12 à 24 acides aminés. Par contre la région centrale du peptide, interagissant spécifiquement avec la molécule de CMH de classe II, n'est toujours composée que de neuf acides aminés (P1 à P9). Les régions flanquantes du peptide sont très importantes et ont une fonction non négligeable: (a) elles augmentent l'affinité de la molécule de CMH de classe II pour le peptide en formant des liaisons hydrogène avec la molécule de CMH de classe II (99,100), (b) elles induisent un changement de conformation du peptide et du complexe CMH/peptide: le complexe CMH/peptide peut adopter une forme compacte ou relaxée, différenciables en gel SDS/PAGE, suivant les résidus qui le flanquent (101), (c) la région flanquante est



également reconnue par le TCR (100), (d) enfin, les régions flanquantes protègent la région centrale du peptide de la protéolyse. En effet, l'apprêtement des peptides se poursuit encore alors que le peptide est logé dans le sillon de la poche peptidique. Les régions flanquantes sont dégradées par des exopeptidases ce qui explique que les peptides naturellement apprêtés aient des longueurs différentes. Le fait de retrouver très fréquemment une proline en position P-2 du peptide ainsi que de nombreuses prolines dans la région flanquante située en C-terminal confirme la dégradation des régions flanquantes par des exopeptidases car les prolines sont connues pour en bloquer l'activité enzymatique (Figure 6) (99). Une autre étude a montré que l'on retrouvait souvent des résidus basiques en C-terminal du peptide, ce qui favoriserait son apprêtement (102).

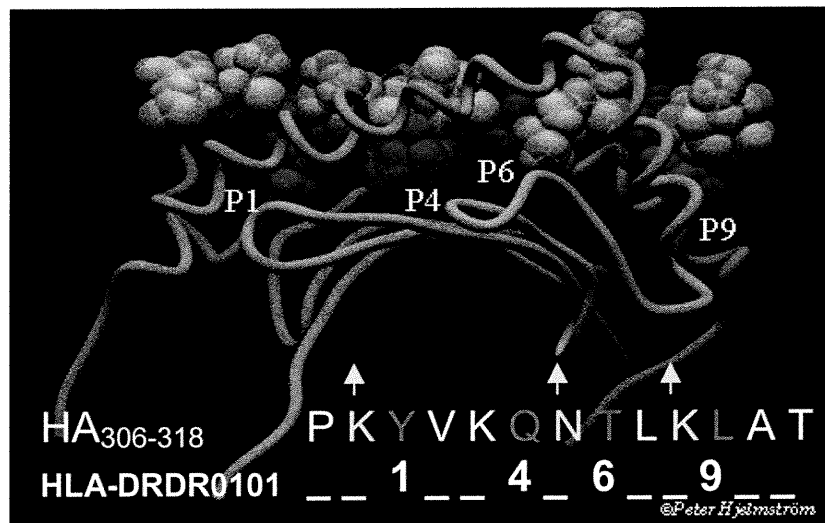
P-2	P-1	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17
											P	P	P	P	P			

**FIGURE 6.** *Motif d'apprêtement des peptides ligands du CMH de classe II.*

*Conformation du peptide:*

Si on regarde la structure du peptide HA<sub>306-318</sub> lié à la molécule HLA-DR0101, le peptide a une structure "torsadée" ressemblant à une hélice polyproline de type II (95-98). C'est une structure que l'on retrouve pour la plupart des peptides se fixant sur les molécules HLA-DR. Dans tous les cas, les chaînes latérales des résidus P1, P4, P6, P7 et P9 sont enfoncées dans les poches d'ancrage de la poche peptidique, alors que celles des résidus P-2, P-1, P2, P3, P5, P8, P10 et P11 sont exposées vers l'extérieur de la poche peptidique (Figure 7). Les chaînes latérales des résidus P-1, P5 et P8 pointent bien en dehors du sillon peptidique vers le TCR (Figure 7). Si on superpose la chaîne principale de différents peptides ligands des molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401, on s'aperçoit que leur structure sont très fortement superposables. Cette structure est quasiment identique pour les résidus P-2 à P5 car les poches peptidiques sont pratiquement identiques à ce niveau là: en effet

le seul résidu polymorphique est le n°86 et il se situe au fond de la poche P1. Le reste de la chaîne peptidique a une position plus ou moins haute ou enclavée dans le sillon peptidique à cause du polymorphisme des poches P6, P7 et P9 (96,98): cette différence, de l'ordre de 1 à 2 Å, est minime. Étant donné que les peptides sont en contact étroit avec la poche peptidique, du fait de la présence de liaisons hydrogène entre les résidus non polymorphes de la molécule de CMH de classe II et la chaîne carbonée du peptide, ils ont une structure plutôt linéaire. La conformation du peptide est essentielle dans la reconnaissance antigénique: il a été montré que la mutation du peptide Hb (E73D)/I-E<sup>k</sup> au résidu d'ancrage P6 provoquait localement un changement minime de conformation, notamment au niveau du résidu P8, ce qui a pour conséquence d'altérer la reconnaissance par le TCR (103). D'autres études, dans lesquelles certains résidus d'ancrage sont mutés, montrent également une influence sur la réponse de la cellule T (104-106).



**FIGURE 7.** Sites de liaison du peptide HA<sub>306-318</sub> à la molécule HLA-DR1. Les résidus d'ancrage sont indiqués en gris foncé et les résidus pointant vers le TCR en gris clair. D'après Peter Hjelmström (<http://depts.washington.edu/rhwlab/dq/3structure.html>).

#### 2.3.1.4. Universalité des peptides

Certains peptides sont capables d'interagir avec plusieurs allèles DR voire tous les DR: c'est ce que l'on appelle le phénomène d'universalité. On définit des résidus d'ancrage universels se situant dans la première moitié du peptide (poche P1 et P4) et des résidus d'ancrage allèle-spécifiques dans la deuxième moitié du peptide (poche P6, P7 et P9). Étant donné que la chaîne  $\alpha$  est invariante, les résidus universels doivent plutôt interagir avec des résidus de la chaîne  $\alpha$  alors que les résidus allèle-spécifiques doivent plutôt interagir avec des résidus polymorphiques de la chaîne  $\beta$  (107). Le peptide HA<sub>306-318</sub> peut se fixer sur plusieurs molécules DR. C'est la poche P1 qui détermine si le peptide va se fixer ou non: la poche P1 des molécules DR0101 et DR0401 fixe la tyrosine 308 et donc le peptide HA<sub>306-318</sub> de la même manière. Par contre la poche P1 de la molécule DR1501 fixe la valine 309. Ceci est dû au polymorphisme glycine/valine en position 86 (108), la valine de la chaîne DRB1\*1501 ne favorisant pas la fixation d'une tyrosine qui est beaucoup trop encombrante. L'exemple le plus frappant d'universalité est celui de la chaîne invariante (Ii): des peptides CLIP peuvent se lier dans la poche peptidique de à peu près toutes les molécules de CMH de classe II.

#### 2.3.1.5. Motifs d'interaction et structure des poches d'ancrage de la molécule HLA-DR (82, 95-98, 109-114) (Annexes 10,11 et 12)

- La spécificité de la poche d'ancrage P1 est déterminée par le polymorphisme Glycine/Valine à la position 86. Quand ce résidu est une glycine (HLA-DR0101 et -DR0401), la poche est plus large et favorise la liaison des chaînes latérales de résidus hydrophobes et/ou aromatiques comme par exemple la tyrosine ou la phenylalanine. Si le résidu 86 est une valine (HLA-DR1501 et -DR0301), la chaîne latérale de la valine réduit la taille de la poche ce qui n'autorise plus que la liaison de résidus à chaîne aliphatique et prohibe celles de résidus aromatiques. La poche P1 est une poche plutôt hydrophobe.

- La poche d'ancrage P4, dans le cas des molécules HLA-DR0101 et HLA-DR0401, est constituée principalement par un acide aminé chargé positivement comme la lysine (HLA-DR0401) ou l'arginine (HLA-DR0101) ce qui interdit la fixation d'acides aminés chargés positivement: un résidu aliphatique ou un résidu chargé négativement sont donc favorisés. Pour la molécule HLA-DR1501, la poche P4 est largement hydrophobe et accepte préférentiellement des résidus aromatiques ou aliphatiques. Par contre elle ne fixera jamais un acide aspartique. L'alanine 71 crée une poche profonde qui peut accueillir des acides aminés comme la phénylalanine.
- La poche d'ancrage P6 est dépendante de l'encombrement stérique des acides aminés qui la composent. Dans le cas de la molécule HLA-DR0101, des petits résidus aliphatiques sont favorisés car les résidus monomorphiques qui composent la poche sont une leucine et une proline. Dans le cas de la molécule HLA-DR0301, vu que ce sont des sérines qui participent à la spécificité de la poche, des résidus plus encombrants comme la lysine, l'arginine ou l'acide glutamique sont favorisés. Pour la molécule HLA-DR1501, la poche P6 est une poche polaire globalement chargée négativement malgré la présence d'une arginine.
- La poche d'ancrage P9 est dépendante de la charge de ses résidus: si elle est constituée de tryptophane et d'acide aspartique comme dans le cas des molécules HLA-DR0101 et -DR1501 des résidus hydrophobes sont préférés. La présence d'acide aspartique et d'acide glutamique (HLA-DR0301 et -DR0401) peut autoriser, en plus des résidus hydrophobes, la fixation d'acides aminés chargés positivement.

### 2.3.2. Conformation du complexe CMH/peptide.

Il a été montré que le peptide provoquait un changement de conformation de la molécule de CMH de classe II. Quand le peptide se fixe, la molécule de CMH de classe II passe d'une forme relaxée à une forme compacte. Ce changement de conformation consiste en une condensation de la molécule de CMH de classe II

autour du peptide. C'est principalement l'occupation de la poche P1 qui est responsable de ce changement de conformation et de l'exposition des chaînes latérales du peptide vers le TCR. Une occupation partielle de la poche P1, provoque un changement de conformation du peptide en entier ce qui a des conséquences sur la reconnaissance antigénique. La chaîne carbonée du peptide entre les résidus P-1 et P2 joue également un rôle car ces résidus forment des liaisons hydrogène avec des acides aminés de la molécule de CMH de classe II connus comme étant importants dans la stabilisation du complexe CMH/peptide (96, 115, 116).

## INTRODUCTION AU TRAVAIL ET BUT DU PROJET

L'identification, la quantification et la caractérisation phénotypique et fonctionnelle des cellules T spécifiques à un antigène lors d'une infection virale sont essentielles à la compréhension de la réponse immunitaire cellulaire.

La détection des cellules T spécifiques à un antigène se fait traditionnellement par des tests fonctionnels comme la mesure de l'activité cytolytique pour les cellules T CD8<sup>+</sup> et la mesure de la production d'interleukine 2 pour les cellules T CD4<sup>+</sup>. Il s'agit donc d'une *détection indirecte*. Afin d'augmenter la sensibilité de ces tests, il est nécessaire de faire proliférer la population de cellules T d'intérêt *in vitro*, pendant 7 à 10 jours, avant de mesurer l'activité effectrice de ces cellules. Ceci implique donc que les cellules survivent, se divisent et conservent leur fonction *in vitro*. De plus il faut s'assurer que la méthode de stimulation est efficace et reproductible.

Le protocole standard utilisé pour estimer le nombre de cellules spécifiques d'un virus, jusqu'à présent, était la méthode de dilution limite ou LDA (Limiting Dilution Assay) (117). C'est une technique de microculture où les lymphocytes subissent au moins 10 cycles de réplication avant que l'on mesure leur activité effectrice. Même si la stimulation a été optimale, cette technique ne permet de quantifier que les cellules qui peuvent survivre et proliférer pendant deux semaines de culture. Or, une stimulation prolongée de cellules déjà activées peut induire leur apoptose par AICD (Activated induced cell death). Il a été clairement montré que l'on sous-estimait le nombre de cellules effectrices par cette méthode.

D'autres méthodes, basées sur l'induction de la production de cytokines, sont utilisées pour mesurer la réponse lymphocytaire T spécifique d'un antigène. Ces méthodes ne nécessitent pas la prolifération *in vitro* des lymphocytes T, mais sont limitées par le fait que la production de cytokines est transitoire et qu'il existe des sous-types cellulaires (Tc1/Tc2 pour les lymphocytes CD8<sup>+</sup> et Th1/Th2 pour les lymphocytes CD4<sup>+</sup>) qui ne sécrètent pas les mêmes cytokines.

Une de ces méthodes est l'ELISPOT (Enzyme-Linked Immunospot assay): cette technique permet de détecter, avec un anticorps anti-cytokine, les molécules

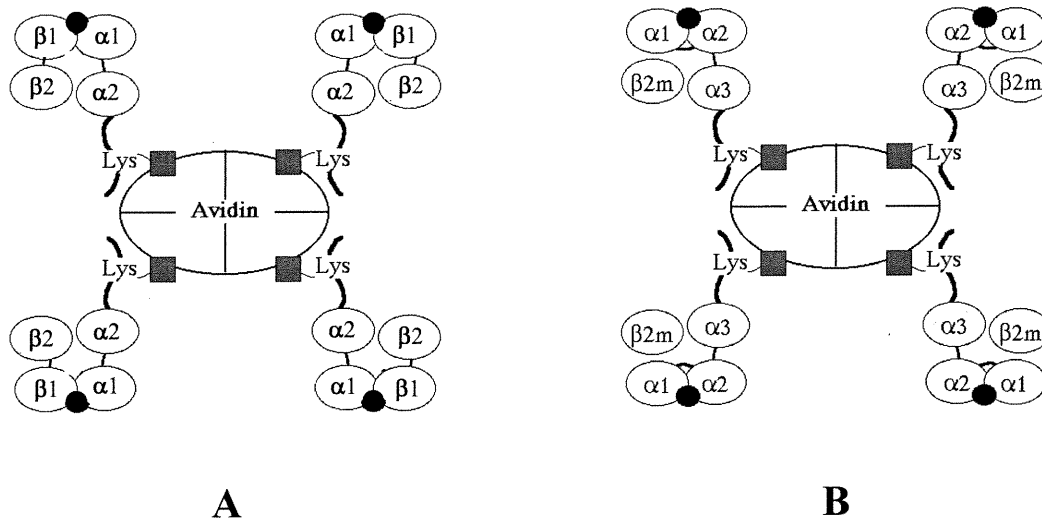
sécrétées lors de l'activation de cellules T. La coloration intracellulaire de cytokines, faisant appel à la cytofluorométrie, permet de détecter les cytokines produites à l'intérieur d'une cellule. Malgré certaines limites, ces deux techniques ont montré qu'elles étaient relativement sensibles.

La *détection directe* des cellules T spécifiques à un antigène avec des tétramères de CMH a révolutionné la façon d'analyser la réponse immunitaire anti-virale et a permis de réévaluer l'ampleur de cette réponse.

Altman *et al.* ont été les premiers à générer des complexes tétramériques de CMH (118). Les tétramères sont un nouveau genre de réactifs utilisant le ligand naturel du TCR, c'est-à-dire le complexe CMH-peptide, comme sonde pour détecter des cellules T spécifiques d'un antigène. Du fait de la faible affinité du complexe CMH-peptide pour le TCR, il a été nécessaire de multimériser ce complexe afin d'en accroître l'avidité pour les cellules T. Un tétramère est un complexe soluble formé de 4 monomères de HLA/peptide. Une des chaînes de la molécule de HLA est biotinylée par l'enzyme BirA sur un résidu lysine contenu dans une séquence consensus de 15 acides aminés. Une molécule de streptavidine couplée à un fluorochrome peut lier quatre molécules de CMH biotinylées (Figure 8).

Différentes études ont montré que l'utilisation de tétramères de CMH permet une analyse beaucoup plus fine et rapide que celle donnée par des techniques conventionnelles (comme le LDA).

Altman *et al.* ont développé des complexes tétramériques HLA-A2-Gag/Pol qui ont permis de montrer qu'il y avait jusqu'à 2% de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de Gag et Pol dans le sang périphérique de patients infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (118). Ce pourcentage est considérablement plus important que celui qui avait été estimé par LDA (0.0005% à 0.025%). Dans une infection SIV (Simian Immunodeficiency Virus) persistente, les cellules T CD8<sup>+</sup> (détectées avec des tétramères de CMH de classe I) spécifiques à un épitope SIV correspondent à 10% des cellules T CD8<sup>+</sup> du sang (119). Ogg *et al.*, dans une étude montrant que chez des patients infectés par le VIH le nombre de cellules spécifiques



**FIGURE 8.** Représentation schématique de tétramères de CMH de classe II (A) et de CMH de classe I (B). (D'après Ahmed et Biron, *Fundamental immunology*, quatrième édition, édité par W.E. Paul)

Les domaines solubles des molécules de CMH de classe I et de classe II sont biotinylés par l'enzyme BirA sur une séquence fusionnée à l'extrémité C-terminale du domaine  $\alpha 3$  pour le CMH de classe I et du domaine  $\alpha 2$  pour le CMH de classe II. Chaque monomère de CMH biotinylé (■) et liant de façon covalente un peptide antigénique (●) est incubé avec de la streptavidine couplée à un fluorochrome, ceci à un ratio molaire de 1:4 pour former des tétramères. Ces tétramères sont alors utilisés en cytométrie en flux pour identifier les cellules T spécifiques d'un antigène.

du VIH, et donc tétramères positives, était inversement proportionnel à la charge virale, ont confirmé que 0.1 à 2 % des cellules  $CD8^+$  sont spécifiques de HIV lors de la phase chronique de la maladie (120). Le groupe de Ahmed a évalué la fréquence de cellules T  $CD8^+$  spécifiques de LCMV, avec des tétramères de CMH de classe I, à plus de 50% des cellules de la rate dans le cas d'une infection aiguë (121). Avant l'utilisation des tétramères, on pensait que la majorité de cette expansion était due à une activation non spécifique: les tétramères ont montré que lors d'une infection aiguë, 50 à 70% des cellules sont antigène-spécifiques. Ces résultats ont été confirmés par le groupe de Zinkernagel (122). Busch *et al.*, dans le contexte d'une



infection bactérienne avec *Listeria monocytogenes*, ont également constaté que l'on sous-estimait le nombre de cellules T CD8<sup>+</sup> par la méthode de LDA mais que par contre la cinétique et la durée de la réponse lymphocytaire T étaient correctes (123). Crawford *et al.* ont été les premiers à obtenir des tétramères de CMH de classe II: ils ont montré que l'on pouvait faire un lien entre la coloration avec les tétramères et l'affinité du TCR pour le complexe CMH/peptide (74). Novak *et al.* ont produit des tétramères HLA-DR4 qui leur ont permis de déterminer la fréquence de cellules spécifique du peptide HA dans le sang de personnes vaccinées (124). Kotzin *et al.* ont montré avec des tétramères HLA-DR4 que, dans le cadre de l'arthrite rhumatoïde, la plupart des cellules T CD4<sup>+</sup> présentes au niveau du cartilage ne sont pas dirigées contre les épitopes dominants CII et HCgp39 (125).

Les tétramères sont un outil qui a montré une spécificité et une sensibilité très importante et qui permet de détecter des cellules à très basse fréquence. Cependant, on peut envisager de nombreuses autres applications aux tétramères de CMH de classe I et de classe II. Tout comme ils permettent de détecter et d'énumérer des cellules antigène-spécifiques lors d'une infection virale, on peut quantifier et analyser la réponse immunitaire contre des antigènes tumoraux, autoréactifs lors de maladies autoimmunes et alloréactifs lors de rejets de greffe. Le fait que l'on puisse coupler cette détection avec une analyse multiparamétrique au FACS permet de définir et de quantifier certains sous-types cellulaires, comme les cellules mémoires, au sein d'une population. Couplé avec une coloration au CFSE, c'est une méthode qui permet de mesurer le potentiel prolifératif de cellules suite à la reconnaissance d'un antigène. Les tétramères peuvent également être utilisés pour trier des cellules antigène-spécifiques afin de les caractériser fonctionnellement et phénotypiquement: en effet une population qui contient moins de 0.5% d'un sous-type cellulaire est clairement à la limite de détection du FACS; il est donc possible d'enrichir la population en utilisant des billes magnétiques captant les cellules tétramères positives. On peut enfin trier des populations de différentes affinités en se basant sur l'intensité de leur coloration par les tétramères.

Le fait que l'on puisse aller stimuler de façon antigène-spécifique des cellules avec des tétramères va permettre de caractériser les signaux induits par différents peptides tels que des peptides agonistes, agonistes partiels ou antagonistes. Il a en effet été montré que l'on pouvait moduler la réponse antigène-spécifique en anergisant des cellules autoréactives par l'intermédiaire de tétramères administrés *in vivo* (126).

Les tétramères peuvent également servir à déterminer de nouveaux épitopes dans de nombreuses pathologies: en utilisant des peptides chevauchant couvrant la séquence de la protéine VP16 du virus HSV-2, Novak *et al.* ont identifié quatre nouveaux épitopes HLA-DR0401 et deux HLA-DR0404 (127). On peut, enfin, imaginer administrer des tétramères *in vivo* pour des essais de vaccination.

Étant donné l'importance toute particulière de la réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> lors d'infections virales, nous avons choisi de générer des tétramères de CMH de classe II pour analyser cette réponse dans des infections chroniques telles que le VIH et VHC (Virus de l'hépatite C). De plus le fait de posséder une telle technologie est vraiment un atout car les applications sont très nombreuses.

# CONSTRUCTION DE TÉTRAMÈRES DE CMH DE CLASSE II HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301, -DR0401 LIANT DE FAÇON COVALENTE LE PEPTIDE ANTIGÉNIQUE

Les tétramères de CMH de classe II sont, comme on vient de le voir, un outil formidable pour la caractérisation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ainsi que pour des études fonctionnelles et structurales. Nous avons donc décidé de générer des tétramères de CMH de classe II afin de pouvoir étudier le rôle des cellules T CD4<sup>+</sup> dans le contexte d'infections virales, de maladies autoimmunes, de rejet de greffes et de cancers.

Le fait que la formation d'une molécule de CMH de classe II soluble nécessite l'interaction de trois composants, qui sont la chaîne  $\alpha$ , la chaîne  $\beta$  et le peptide, rend la formation de tétramères assez complexe. Nous avons donc choisi de produire, dans un système eucaryote, des molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401 liant de façon covalente le peptide antigénique (129).

## *Stratégie de clonage*

Pour produire nos molécules de CMH de classe II solubles, les chaînes DR $\alpha$  et DR $\beta$  ont été sous-clonées dans le vecteur d'expression eucaryote pMT.

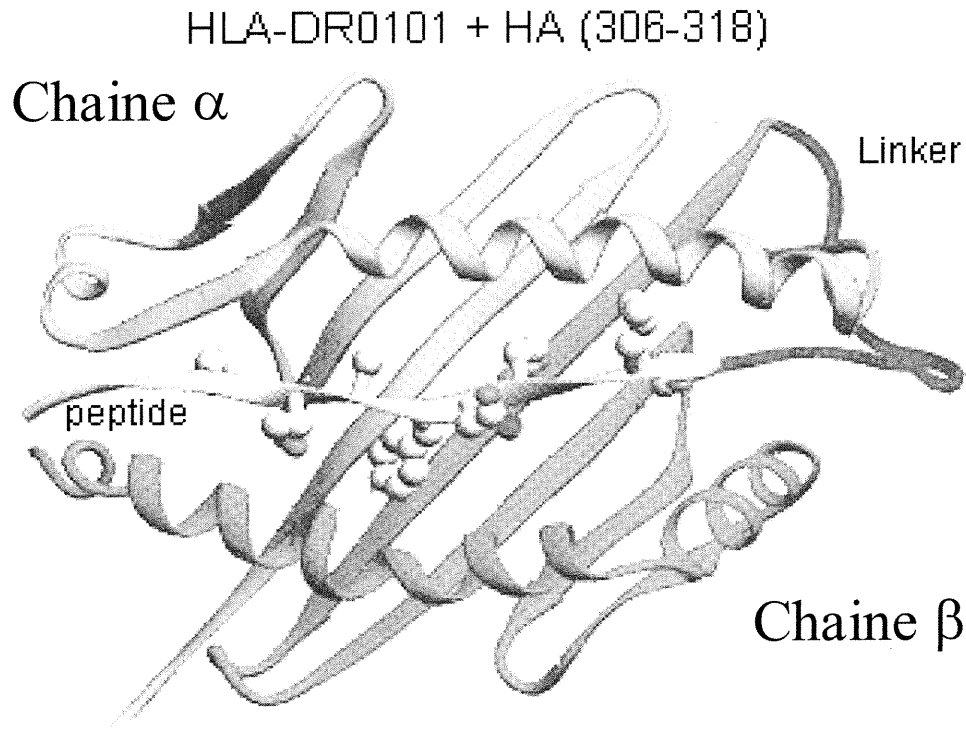
- La chaîne  $\alpha$

Le domaine extracellulaire de la chaîne  $\alpha$  est fusionné, en C-terminal, avec une séquence substrat de l'enzyme BirA (128). La BirA est une enzyme d'*E.Coli* qui ajoute une biotine sur un résidu lysine d'une séquence consensus de 13 acides aminés. Plusieurs séquences ayant été décrites, nous avons choisi la séquence n°41, cette séquence ayant déjà été utilisée par Altman *et al.*, pour produire des tétramères de CMH classe II (118).

- La chaîne  $\beta$

Le domaine extracellulaire de la chaîne  $\beta$  lie de façon covalente le peptide antigénique par l'intermédiaire d'un linker fusionné en N-terminal (Figure 9). Le

linker est un polypeptide de 15 acides aminés riche en glycine dont le motif est  $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3$  (129).

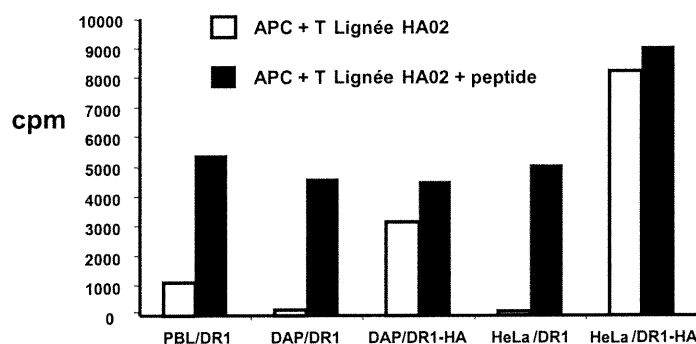


**FIGURE 9.** Structure de la molécule de CMH de classe II HLA-DR0101 liant de façon covalente le peptide  $\text{HA}_{306-318}$ . Tiré de Fremont *et al.* 1996. Science. 272 :1001-1004 (129).

Des études antérieures ont montré que les peptides liés de façon covalente sur la molécule de classe II se fixent bien dans la poche peptidique et conservent leur pouvoir d'être reconnu par des cellules T spécifiques (74).

Nous avons également montré que le linker ne gênait pas l'expression et la fonction de nos molécules de CMH de classe II. Des cellules DAP-3 et Hela, transfectées par la molécule HLA-DR0101/ $\text{HA}_{306-318}$  liant de façon covalente le peptide  $\text{HA}_{306-318}$ , expriment à leur surface des molécules HLA-DR0101, ces molécules ayant une bonne conformation car elles sont détectées par l'anticorps L243 (L243 reconnaît un épitope conformationnel de la molécule HLA-DR) (Données non montrées). On a

également observé la prolifération (mesurée par incorporation de [<sup>3</sup>H]thymidine) d'une lignée HA02 spécifique du peptide HA<sub>306-318</sub> présenté dans le contexte HLA-DR0101 (Figure 10). Les CPA utilisées dans ce test étaient soit des PBMC d'un individu HLA-DR0101 chargées avec le peptide HA<sub>306-318</sub> (les mêmes PBMC à partir desquelles la lignée a été générée), soit les cellules DAP-3 et Hela transfectées par la molécule HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> liant de façon covalente le peptide HA<sub>306-318</sub>, soit enfin des cellules DAP-3 et Hela transfectées par la molécule HLA-DR0101 vide chargées avec le peptide. Les cellules transfectées par notre construction induisent la prolifération de la lignée HA02 de manière plus importante que les PBMC ou la molécule HLA-DR0101 vide chargées avec le peptide. En conclusion, la séquence et la longueur du linker permettent de donner une bonne conformation à la molécule de CMH de classe II et n'altèrent donc pas l'expression et la fonction de nos molécules de CMH de classe II.



**FIGURE 10.** Fonctionnalité de la molécule HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> liant de façon covalente le peptide HA<sub>306-318</sub>. La lignée HA02 est stimulée pendant 72 h avec des CPA (PBL de type HLA-DR0101; DAP-3 et Hela transfectées par le complexe HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> ou HLA-DR0101 vide), à un ratio de 1:1, et ce avec ou sans le peptide HA<sub>306-318</sub> (1 µg/ml). L'incorporation de [<sup>3</sup>H]thymidine se fait dans les 16 dernières heures de culture.

Ce système est très avantageux car on obtient un rendement de molécules étant chargées avec le peptide nettement plus élevé que dans la cas où l'on utilise un

peptide soluble qui est soumis à des dégradations cellulaires. De plus le peptide antigénique faisant partie de la construction, les coûts de production sont diminués puisqu'il n'est pas nécessaire d'utiliser des peptides de synthèse extrêmement chers.

- Flexibilité du vecteur.

Nous nous sommes assurés de cloner les chaînes DR $\alpha$  et DR $\beta$  de telle manière que l'on puisse par simple digestion cloner une autre chaîne DR $\beta$  ou bien cloner un autre peptide. La chaîne DR $\beta$  se change par une digestion unique Spe I/Stu I et le peptide par digestion EcoR I/Mlu I (Figure 11). C'est donc un système extrêmement flexible qui nous permet de générer toute une batterie de molécules HLA-DR en une seule étape de clonage.

#### *Système de production*

Nous avons choisi de produire les molécules de CMH de classe II dans un système eucaryote afin de faciliter la production et d'augmenter le rendement. En effet toutes les étapes de la purification des protéines à partir des corps d'inclusion (agrégat de protéines formés chez *E. Coli*) et de renaturation des protéines (consistant à dénaturer et mixer les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  en les diluant dans un tampon contenant un excès de peptide afin de leur donner une bonne conformation) sont évitées. De plus les protéines produites dans un tel système sont modifiées post-traductionnellement et sont donc plus fortement susceptibles d'être actives que celles produites dans un système bactérien.

Les cellules d'insectes *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (cellules S2) sont transfectées par le vecteur d'expression eucaryote pCV contenant notre construction.

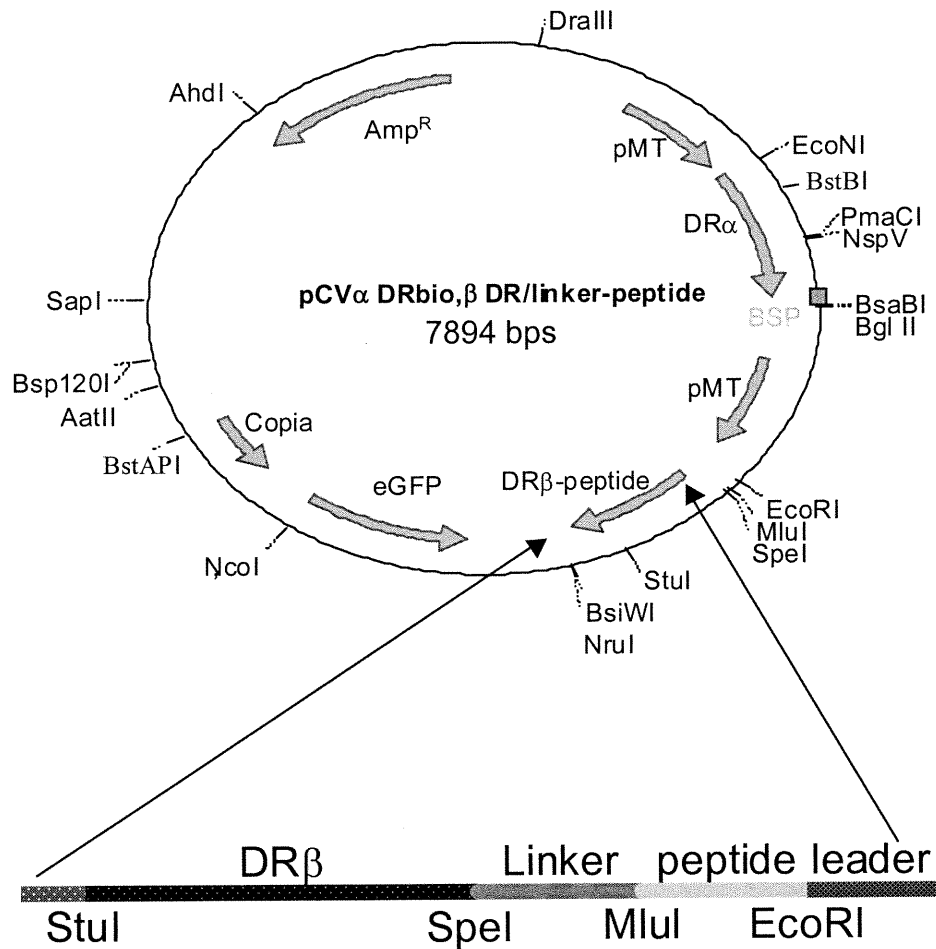
Ce vecteur, modifié à partir du vecteur d'expression eucaryote pMT, est constitué :

- du gène codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) qui est sous contrôle du LTR de drosophile COPIA (expression constitutive).
- Des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , avec leur séquence leader, clonées en aval du promoteur pMT. Le promoteur pMT est inductible par le cuivre. C'est un promoteur très

fort et sans activité basale ce qui élimine tout problème de mort cellulaire dû à la surexpression d'une protéine étrangère.

Les cellules S2 sont faciles à cultiver, elles ont un temps de doublement extrêmement rapide (24 heures) et atteignent une concentration très élevée (15 millions de cellules/ml). Afin d'établir des lignées stables, on co-transfecte le plasmide pCV et le plasmide pcophygro qui porte le marqueur de sélection conférant la résistance à l'hygromycine. Des transfectants stables permettent la production de grande quantité de protéines. Le niveau d'expression des molécules de CMH de classe II est contrôlé par le niveau d'expression de GFP mesuré au FACS.

Les molécules de CMH de classe II sont purifiées à partir des surnageants récoltés après induction de la production par le cuivre.



**FIGURE 11.** Flexibilité du vecteur eucaryote permettant la production des molécules de HLA-DR/peptide.

### Choix des peptides

Les peptides utilisés (Tableau 3) ont tous la propriété de bien se lier aux molécules HLA-DR que l'on a choisies. De plus ils ont un pouvoir immunogénique très fort dans le contexte des ces molécules HLA-DR.

Molécules HLA-DR	Peptide	séquence	Organisme	Protéine
DR0101	HA <sub>306-318</sub>	PKYVKQNTLKLAT	Influenza	Protéine A (hémagglutinine)
DR1501	TT <sub>830-843</sub>	QYIKANSKFIGITE		Tetanus Toxoid
DR0301	pp65-1 <sub>009-023</sub>	PEMISVLGPISGHVL	CMV	Phosphoprotéine de la matrice pp65
DR0401	pp65-2 <sub>488-501</sub>	QAGILARNLVPMVAT	CMV	Phosphoprotéine de la matrice pp65
	IE1 <sub>088-102</sub>	QIKVRVDMVRHRIKE	CMV	Immediate-early protein

**TABLEAU 3.** Séquences des peptides clonés dans les molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401.

Pour la mise au point du système, on a sélectionné des peptides déjà décrits dans la littérature et dont on connaît les caractéristiques de liaison aux molécules HLA-DR (Tableau 4). La fixation de ces peptides a été déterminée par des expériences de compétition (déplacement de la liaison du peptide avec un peptide standard marqué, à la biotine par exemple, ayant une forte affinité pour la molécule de CMH de classe II d'intérêt) ou par des expériences de fixation directe (la fixation du peptide biotinylé sur la molécule HLA-DR est détectée au FACS en utilisant de la streptavidine couplée à un fluorochrome). Des algorithmes, tel que celui de Rammensee (130), permettent de prédire la liaison de peptides sur les molécules de CMH classe II. Ces programmes informatiques sont appréciables à titre indicatif mais se révèlent ne pas être aussi fiables que l'oeil d'un expert!



HLA-DR	Fixation du peptide (UA)				
	HA	TT	pp65-1	pp65-2	IE1
HLA-DR0101	9	10	30	8	1
HLA-DR1501	6	10	15	15	1
HLA-DR0301	3	1	12	4	7
HLA-DR0401	6	6	20	12	1

**TABLEAU 4.** *Affinité des peptides HA<sub>306-318</sub>, TT<sub>830-843</sub>, pp65-1<sub>009-023</sub>, pp65-2<sub>488-501</sub> et IE1<sub>088-102</sub> pour les molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401. D'après l'algorithme de Rammensee. UA = unité arbitraire*  
(<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/Scripts/MHCServer.dll/EpPredict.htm>)

#### *Choix des allèles HLA-DR*

Le complexe majeur d'histocompatibilité est constitué d'une série de gènes très polymorphes. Pour les molécules de HLA-DR, on connaît jusqu'à présent plus de 250 allèles ce qui fait que l'expression de ces molécules est très diverse au sein de la population. Pour être en mesure d'analyser la réponse immunitaire du plus grand nombre de personnes possible, il est donc important de générer un panel de molécules qui permettent de couvrir une population la plus vaste possible.

D'après les fréquences des allèles HLA-DR répertoriées lors du XI<sup>ème</sup> International histocompatibility workshop and conference (Yokohama, Japon, 1991), l'utilisation des quatre allèles HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401 nous permet de couvrir 40% de la population canadienne et près de 50% de la population mondiale (Tableaux 5 et 6).

	DR1			DR2		DR4						DR3
<b>Allèle HLA-DRB1</b>	0101	0102	0103	1501	1502	0401	0402	0403	0404	0407	0408	0301
<b>fréquence</b>	5.6	1.2	0.9	10.4	0.6	9.5	0.3	2.9	2.3	1.2	0.6	0

**TABEAU 5.** *Fréquence des allèles des molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401 dans la population canadienne (XI<sup>ème</sup> International histocompatibility workshop and conference).*

molécules HLA-DR	USA(Noirs) ( N = 318 )	USA (Blancs) ( N = 232 )	Canadiens ( N = 146 )	Français ( N = 285 )
<b>DR1</b>	<b>6.3</b>	<b>10.1</b>	<b>12</b>	<b>10.8</b>
<b>DR3</b>	<b>14.7</b>	<b>10.1</b>	<b>11.3</b>	<b>11</b>
<b>DR4</b>	<b>3.4</b>	<b>12.8</b>	<b>18.2</b>	<b>10.8</b>
DR7	9.5	15.1	14.4	13.5
DR8	8.3	3	2.7	5.2
DR9	2.9	1.5	2.1	1.4
DR10	1.1	1.7	0.7	2.5
DR11	13.5	9.7	7.5	9.8
DR12	3.8	1.6	0.7	0.4
DR13	13.8	12.7	11.6	13.2
DR14	2.4	1.5	2.1	3.8
<b>DR15</b>	<b>11.7</b>	<b>10.8</b>	<b>14.4</b>	<b>11.2</b>
DR16	2	1.3	2.1	2.1
<b>Total</b>	<b>36.1</b>	<b>43.8</b>	<b>55.9</b>	<b>43.8</b>

**TABEAU 6.** *Fréquence haplotypique des molécules HLA-DR dans les populations nord américaine et française (XI<sup>ème</sup> International histocompatibility workshop and conference).*

Pour justifier le fait d'avoir choisi de travailler avec les molécules HLA-DR et non HLA-DP ou-DQ, on peut avancer plusieurs arguments:

- La chaîne HLA-DRA est monomorphe: il existe en fait deux allèles (HLA-DRA\*0101 et HLA-DRA\*0102) dont les séquences diffèrent uniquement par un acide aminé dans le domaine transmembranaire, ce qui nous importait peu

car nous produisons des molécules sous forme soluble. De plus les chaînes  $\alpha$  pour les molécules HLA-DQ et HLA-DP sont respectivement au nombre de 20 et de 18 ce qui aurait passablement compliqué la construction de molécules solubles diverses couvrant le plus de monde possible.

- De nombreuses études ont été faites sur les molécules HLA-DR (notamment les molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401 que l'on a sélectionnées). Les poches d'ancrage et les motifs des peptides sont très bien connus. Il est donc plus facile de dessiner des nouveaux peptides afin de voir si ils sont immunogènes et susceptibles d'être des épitopes dans telle ou telle pathologie.
- De plus, les molécules HLA-DR sont impliquées dans l'alloréactivité. En effet les trois loci les plus impliqués dans le rejet de greffe sont les loci HLA-A, -B et -DR. Quand deux allèles du greffon, pour chacun de ces trois antigènes, correspondent à ceux du receveur, on considère qu'il n'y a pas de problème à la transplantation d'organes.
- La plupart des maladies auto-immunes, telles que le diabète de type I, la polyarthrite rhumatoïde, le pemphigus vulgaire et la sclérose en plaque sont génétiquement associées aux molécules HLA de classe II, particulièrement les molécules HLA-DR (131).

En conclusion, on dispose d'un outil et d'un système de production extrêmement performants dont toutes les étapes sont contrôlées par des tests de qualité. Nous pouvons, de plus, travailler avec de nombreux types de cohortes de patients car les allèles choisis sont les plus fréquents dans les populations canadienne et mondiale. En outre, si l'on veut travailler sur un individu particulier, on peut facilement, par simple digestion, obtenir le tétramère correspondant.

La spécificité de nos tétramères est validée en générant des lignées T CD4<sup>+</sup> spécifiques des peptides utilisés.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 1. CONSTRUCTION DE MOLÉCULES DE MHC CLASSE II SOLUBLES LIANT DE FAÇON COVALENTE LE PEPTIDE ANTIGÉNIQUE (Annexe 8).

Quatre molécules de MHC classe II (HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401) ont été préparées.

### 1.1. Clonage de l'ADNc des chaînes HLA-DRB1\*0101, -DRB1\*1501, -DRB1\*0301 et -DRB1\*0401.

L'ADNc codant pour les régions extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique (résidus 4 à 238) (Annexe 3) de chacune des chaînes  $\beta$  des molécules de classe II a été amplifié par PCR à partir d'ADNc déjà clonés au laboratoire. Les oligonucléotides utilisés (5'DRBF'/Spe I et 3'DRBF/Pvu II) (Annexe 9) ont généré un fragment Spe I/Pvu II d'une longueur de 759 paires de base (pb), le site Spe I se trouvant au milieu du linker (Annexe 5). Les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur bluescript pBS-KS+ modifié (Vecteur pBS-KS+ où un fragment BamH I/EcoR I de 800 pb a été cloné afin de s'assurer que le plasmide digéré dans le site multiple de clonage est bien linéarisé) dans les sites de restrictions SpeI/EcoRV (EcoR V et Pvu II étant deux enzymes à bouts francs, la ligation du fragment et du vecteur est possible) puis séquencés en utilisant les amorces universelles 5'PU et 3'PR (Annexe 9). Rappelons que chaque fragment d'ADN généré ou vecteur linéarisé a été migré sur un gel d'agarose et a été purifié en utilisant le kit GFX™ (GFX™ PCR DNA and gel band purification kit, Amersham Pharmacia Biotech., Baie d'Urfé, Qc).

### 1. 2. Clonage de l'ADNc de la chaîne HLA-DRA\*0101 et introduction du site de biotinylation.

L'ADNc codant pour la chaîne HLA-DRA\*0101 provient d'un vecteur généré au laboratoire par le Dr F. Denis (Institut Armand Frappier, Laval, Qc) : le vecteur pMT $\alpha$ DRhis, $\beta$ DR1 contient les domaines extracellulaires de la chaîne HLA-

DRA\*0101 (La chaîne  $\alpha$  étant marquée par une séquence poly-histidine en C-terminal) et de la chaîne HLA-DRB1\*0101. Le fragment de gène codant pour le domaine  $\alpha 2$  de la chaîne  $\alpha$  (résidus 107 à 193) (Annexe 4) a été amplifié par PCR avec les oligonucléotides 5'DRalpha et 3'DR alphabio (Annexe 9), introduisant ainsi une séquence de biotinylation (Séquence n° 41) (128) et le site de restriction Bgl II en aval du domaine  $\alpha 2$  (Annexe 5). L'amplicon de 324 pb, digéré par les enzymes BstB I et Bgl II, est réintroduit dans le plasmide pMT, le site de restriction Bgl II étant présent dans le plasmide pMT $\alpha$ DRhis, $\beta$ DR1. Le nouveau vecteur s'appelle pMT $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1.

### **1.3. Construction du peptide HA lié de façon covalente à la chaîne HLA-DRB1\*0101.**

Un fragment Sac I/Sac II correspondant à la fin de la séquence leader et à une partie du domaine  $\beta 1$  de la chaîne HLA-DRB\*0101 (résidus -8 à 75) (obtenu par digestion du plasmide pMT $\alpha$ DRhis, $\beta$ DR1) est cloné dans le vecteur bluescript pBS-KS+. Un site Mlu I est introduit, par overlapped PCR (avec les amorces 5'Mlu I, 3'Mlu I, 5'PU et 3'PR) à l'extrémité 5' du domaine  $\beta 1$  afin de pouvoir y cloner le linker en amont (Annexe 6). La séquence nucléotidique codant pour le linker riche en glycine (129) a été synthétisée en hybridant deux oligonucléotides (Annexe 6). Le site Spe I au milieu du linker permet de cloner n'importe laquelle des chaînes HLA-DRB1 amplifiée par 5'DRBF'/Spe I et le site Mlu I en amont du linker permet de cloner n'importe quel peptide. Le fragment codant pour le linker est introduit dans le plasmide pBS-KS+ digéré par l'enzyme Mlu I: cet oligonucléotide a permis d'éliminer le site Mlu I en aval du linker. Le peptide HA<sub>306-318</sub>, synthétisé en hybridant les deux oligonucléotides 5'HA et 3'HA (Annexes 6 et 9), est inséré dans le site de restriction Mlu I. Afin de s'assurer que les fragments clonés sont tous dans la bonne orientation et que les cadres de lecture sont préservés, les constructions ont été séquencées. Le fragment Sac I/Sac II a ensuite été réintroduit dans le vecteur pMT $\alpha$ DRhis, $\beta$ DR1. Cette nouvelle construction s'appelle pMT $\alpha$ DRhis, $\beta$ DR1/linker/HA.

#### **1.4. Construction du vecteur pMT $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1/linker/HA.**

Un fragment Bsp I/ Bsp I, codant pour toute la chaîne  $\beta$ DR1/linker/HA, est obtenu par digestion du plasmide pMT $\alpha$ DRhis, $\beta$ DR1/linker/HA. Le fragment est alors cloné dans le vecteur pMT $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1 digéré par les mêmes enzymes de restriction. Le nouveau vecteur généré est le pMT $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1/linker/HA.

NB: Afin de pouvoir changer le peptide de façon très facile et de ne pas avoir à se soucier du sens du clonage, le site de restriction Mlu I à l'extrémité 5' du peptide a été changé pour le site unique EcoR I en utilisant les oligonucléotides 5'HAEcoR I et 3'HAMlu I (Annexes 6 et 9).

#### **1.5. Construction du vecteur d'expression eucaryotique pCV $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1/linker/HA à partir du vecteur pMT $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1/linker/HA.**

Pour contrôler le niveau d'expression de nos molécules de CMH de classe II soluble dans les cellules d'insectes, la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) est clonée dans le vecteur pMT. La séquence IRES-EGFP, obtenue par digestion du plasmide MSCV (Fourni par le Dr B. Hawley, Université de Toronto, Toronto, ON), est clonée dans le vecteur pBS-KS+. La séquence IRES a été enlevée et le promoteur CMV (provenant du vecteur pcophygro) cloné en amont de l'EGFP.

NB : le vecteur pCV $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1vide est obtenu par digestion Sac I/Sac II des plasmides pMT $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1 et pCV $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1/linker/HA.

#### **1.6. Clonage des peptides TT<sub>830-843</sub>, IE1<sub>088-102</sub>, pp65-1<sub>009-023</sub>, et pp65-2<sub>488-501</sub> dans le plasmide pCV $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1/linker/HA.**

Le plasmide pCV $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1/linker/HA est digéré par les enzymes EcoR I et Mlu I. Les peptides, provenant de l'hybridation des oligonucléotides 5'TTEcoR I/ 3'TTMlu I, 5'IE1EcoR I/ 3'IE1Mlu I, 5'pp65-1EcoR I/ 3'pp65-1Mlu I et 5'pp65-2EcoR I/ 3'pp65-2Mlu I (Annexe 9), sont insérés dans le vecteur pCV-DR1.

### **1.7. Clonage des allèles HLA-DRB1\*1501, -DRB1\*0301, et -DRB1\*0401 dans le plasmide pCV $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1/linker/HA et pCV $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR1 vide .**

Les inserts  $\beta$ DR1501,  $\beta$ DR0301, et  $\beta$ DR0401 clonés dans le vecteur pBS-KS+ sont digérés par les enzymes de restriction Spe I en 5' (au milieu du linker) et Stu I en 3' (Ce n'est pas gênant que Stu I coupe au milieu du domaine  $\beta$ 2 car ce qui est après le site Stu I est conservé d'un allèle à l'autre. Annexes 1 et 2). Les fragments de 460pb sont clonés dans le plasmide pCV-DR1 lui-même digéré par les enzymes Spe I/Stu I. On a ainsi obtenu les plasmides pCV $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR2/linker/HA ou vide, pCV $\alpha$ DRbio,  $\beta$ DR3/linker/HA ou vide et pCV $\alpha$ DRbio, $\beta$ DR4/linker/HA ou vide.

NB : ce clonage se fait en une seule étape, c'est-à-dire que les trois inserts sont clonés en même temps dans le plasmide pCV digéré. On s'assure de savoir quel  $\beta$ DR a été cloné en comparant les profils de digestion par les enzymes Afl II/Xba I (DR0101), Xcm I (DR1501), Kpn I (DR0301) et Mse I (DR0401) des différents clones obtenus (Annexe 7).

### **1.8. Clonage des peptides TT<sub>830-843</sub>, IE1<sub>088-102</sub>, pp65-1<sub>009-023</sub>, et pp65-2<sub>488-501</sub> dans les plasmides pCV-DRB1\*1501/HA, -DRB1\*0301/HA et -DRB1\*0401/HA.**

Les plasmides pCV-DR1/TT, IE1, pp65-1 et pp65-2 sont digérés par les enzymes Stu I/Mlu I. Ensuite on ligue les inserts issus de cette digestion avec les vecteurs pCV-DR2/HA, -DR3/HA et -DR4/HA digérés par les mêmes enzymes.

NB : ce clonage est également effectué en une seule étape, le DR étant déterminé par digestion avec différents enzymes.

## **2. PATIENTS ET TYPAGE HLA.**

Les PBMC issues d'un individu hétérozygote HLA-DRB1\*0101,-DRB1\*1101 ont été utilisées pour générer une lignée HA<sub>306-318</sub> spécifique. Le typage HLA-DRB1 a été réalisé en utilisant une technique standard de typage moléculaire: la méthode de SSP-PCR (Dr Kelly MacDonald, Département d'immunologie, Université de Toronto, Toronto, ON).

### 3. PEPTIDES.

Les peptides HA<sub>306-318</sub> (PKYVKQNTLKLAT), TT<sub>830-843</sub> (QYIKANSKFIGITE), pp65-1<sub>009-023</sub> (PEMISVLGPISGHVL), pp65-2<sub>488-501</sub> (QAGILARNLVPMVA) et IE1<sub>088-102</sub> (QIKVRVDMVRHRIKE) ont été obtenu par synthèse peptidique en phase solide (Méthode standard de Fmoc [9-fluorenylmethoxycarbonyl chemistry]) et purifié par HPLC (Sheldon Biotechnology Centre, Université McGill, Montréal, Qc). Ils ont une pureté supérieure à 95% comme déterminée par spectroscopie de masse.

Ces différents peptides ont été solubilisés dans de l'eau à une concentration de 250ng/μl, filtrés avec un filtre 0.2μm (Pall Gelman, Pall (Canada) Limitée, Ville S<sup>t</sup> Laurent, Qc) et conservés à -20°C.

### 4. LIGNÉES CELLULAIRES ET HYBRIDOMES.

La lignée cellulaire B lymphoblastoïde **LG2** (homozygote HLA-DRB1\*0101) a été fournie par L.J. Stern (Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA) et a été maintenue en culture dans du RPMI 1640 (Gibco-LifeTechnologies, Burlington, ON) additionné de 10% de sérum de veau foetal (FCS) (Gibco-LifeTechnologies) et 20μg/ml de gentamycine (Gibco-LifeTechnologies). Les cellules fibroblastiques murines **DAP-3**, n'exprimant pas de molécules de MHC classe II, ont été transfectées avec le complexe HLA-DRA\*0101, -DRB1\*0101/HA<sub>306-318</sub>. Cinq millions de cellules DAP-3 ont été électroporées (960 μF, 0.3mV; micropulseur<sup>®</sup>, Bio-Rad Laboratories Canada Ltd., Mississauga, ON) avec les vecteurs SrαneoDRβ-HA et SrαhygroDRα à un ratio de 10:1 (Les vecteurs Srαneo et Srαhygro sont un don du Dr F. Denis, Institut Armand Frappier, Laval, Qc). Elles sont cultivées dans du DMEM (Gibco-LifeTechnologies) supplémenté avec 10% de FCS, 20μg/ml de gentamycine, et l'agent de sélection hygromycine (345U/ml; Gibco-LifeTechnologies). Les cellules **Hela** (cellules humaines carcinomales également transfectées par électroporation avec le complexe HLA-DRA\*0101, -DRB1\*0101 ou le complexe HLA-DRA\*0101,-DRB1\*0101/HA<sub>306-318</sub>)



sont cultivées dans du DMEM, 10% FCS, 20µg/ml gentamycine et 345U/ml d'hygromycine. L'hybridome **L243** (HB55; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) et les hybridomes **XD5.117** et **DA6.147** (132,133), produisant un anticorps anti-HLA-DR PAN, sont cultivés dans du RPMI 1640, 10% FCS et 20µg/ml gentamycine. La lignée cellulaire de lymphome T humain **Jurkat CH7C17**, transfectée avec un unique TCR spécifique du peptide HA<sub>306-318</sub> présenté dans le contexte HLA-DRB1\*0101, nous a été généreusement donnée par le Dr L.R. Wedderburn (Institute of Child Health, UCL, Londres, UK) (134) et a été cultivée dans du RPMI 1640, 10% FCS, 20µg/ml gentamycine et les agents de sélection puromycine (2µg/ml; Sigma-Aldrich, Oakville, ON) et hygromycine (315U/ml).

NB: Toutes ces cellules sont cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> et une humidité relative de 96%. Le FCS utilisé est inactivé pendant 45 minutes à 56°C.

Les cellules d'insectes **Drosophila Schneider 2** (cellules S2) (Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON) sont maintenues en culture dans du milieu Shields and Sang M3 (S&S) (Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de FCS et 20µg/ml de gentamycine.

NB: Ces cellules sont cultivées à 26°C, le taux de CO<sub>2</sub> et l'humidité n'étant pas contrôlés, et à une concentration cellulaire relativement élevée (5 x 10<sup>6</sup> cellules/ml).

## 5. ANTICORPS.

Les anticorps monoclonaux utilisés en cytométrie en flux sont les suivants: l'anti-CD4 couplé aussi bien au -FITC, -PE, -PerCP que -APC (clone SK3; IgG1 souris) (BD Pharmingen, Mississauga, ON), l'anti-CD3-PerCP (clone SK7; IgG1 souris) (BD Pharmingen), l'anti-TCR-PE PAN α/β (clone BMA031; IgG2b souris) (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) et l'anti-Vβ3-FITC (clone CH92; IgM souris) (Immunotech, Beckman Coulter, Mississauga, ON). Les anticorps isotypiques utilisés sont le γ1-FITC, le γ1-PE, le γ2b-PE (BD Pharmingen). En ce qui concerne, la coloration intracellulaire, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-IFNγhumain-FITC (clone 257223.11; IgG2b souris) et son contrôle isotypique γ1-FITC (BD Pharmingen). Le contrôle de perméabilisation est le *perm-a-sure*

(Medicorp, Montréal, Qc): c'est un anticorps IgG1 couplé au FITC qui reconnaît une protéine constitutivement exprimée dans les cellules humaines.

Pour les expériences de compétition, un panel d'anticorps monoclonaux murins anti-CD4 humain a été utilisé: l'anticorps LEU3a (BD Pharmingen); les anticorps B66.6.1 et 101.69 (donnés par le Dr. S. Carrel); les anticorps de la série L (L68, L120, L117, L112) fournis par le Dr. D. Buck (BD Pharmingen) et l'anticorps MT405 (obtenu auprès du Dr. E. P. Rieber) (135). Le contrôle isotypique est le  $\gamma$ 1-FITC. Tous ces anticorps ont été titrés sur des PBMC en venant avec l'anticorps secondaire chèvre anti-souris-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA).

L'anticorps monoclonal anti-HLA-DR utilisé pour purifier les molécules de classe II recombinantes est le L243 (IgG2a souris). Il reconnaît un épitope monomorphique et conformationnel du domaine  $\alpha$ 1 de la chaîne HLA-DR $\alpha$ .

Pour quantifier nos molécules de CMH classe II par ELISA, nous avons utilisé comme premier anticorps les anticorps monoclonaux anti-DR $\beta$  XD5.117 et anti-DR $\alpha$  DA6.147 et comme deuxième anticorps l'anti-HLA-DR biotinylé (clone L243; IgG2a souris) (BD Pharmingen).

Les anticorps polyclonaux utilisés pour les western blot et pour les ELISA sont des sérums de lapin anti-DR $\alpha$  ou anti-DR $\beta$  générés au laboratoire par N. Shoukry (Pediatric hospital, Columbus, OH, USA)

NB: Tous les anticorps non commerciaux sont obtenus par purification des surnageants par chromatographie d'affinité sur une colonne de protéine G Sepharose<sup>®</sup> 4 fast flow (Amersham Pharmacia Biotech.).

## **6. CULTURE CELLULAIRE.**

### **6.1. Purification des cellules mononuclées du sang périphérique.**

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) d'un donneur HLA-DRB1\*0101,-DRB1\*1101 sont isolées par gradient de densité Ficoll-Hypaque (Cellgro, Wisent, Canadian Laboratories, St Bruno, Qc). Le sang, provenant de tubes Vacutainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) contenant comme

anticoagulant l'EDTA, est dilué avec un volume de PBS et déposé sur un volume de Ficoll (2 vol sang/PBS : 1 vol Ficoll). Les gradients sont centrifugés 20min à 400g et à 20°C (1800rpm sur une centrifugeuse Sorvall RT6000B). Suivent alors trois séries de lavage au PBS: un premier lavage à grande vitesse (400g, 10 min, 20°C) pour éliminer le ficoll et deux autres lavages à vitesse plus modérée (300g ou 1200rpm, 10 min, 20°C) pour éliminer les plaquettes. Les cellules sont utilisées le même jour pour obtenir une lignée T ou bien resuspendues dans du FCS/10% diméthylsulfoxyde (DMSO; Sigma-Aldrich) pour congélation à -80°C ou cryoconservation dans l'azote liquide.

## **6.2. Obtention de lignées cellulaires T spécifiques de HA<sub>306-318</sub>.**

Les PBMC isolées du donneur HLA-DRB1\*0101/-DRB1\*1101 sont resuspendues dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum humain de type AB (mâle) (Sigma-Aldrich) et 20µg/ml de gentamycine. Deux millions de PBMC (à 2 x 10<sup>6</sup> cellules/ml) sont stimulées, dans une plaque 24 puits à fond plat (Falcon, VWR, Canlab, Mississauga, ON), avec 1µg/ml de peptide HA<sub>306-318</sub>. Au bout de 7 à 10 jours, les cellules sont restimulées en présence de PBMC autologues irradiées (3000 rad), à un ratio cellules T:APC de 1:1, et de peptide HA<sub>306-318</sub> (1µg/ml). Vingt-quatre heures après la deuxième stimulation, de l'interleukine 2 recombinante (rIL-2 à 200U/ml) est ajoutée au milieu. Ensuite, la lignée est maintenue en la restimulant toutes les semaines avec 1µg/ml de peptide et des PBMC irradiées. Ces lignées polyclonales sont spécifiques au bout de trois cycles de restimulation. Un test de prolifération est réalisé pour s'en assurer.

NB: Les lignées sont incubées à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>.

Lors de la première restimulation, les cellules peuvent-être déplétées en CD8 en utilisant des dynabeads M-450 Rat anti-souris IgG (Dyna, Lake Success, NY, USA) couplées à un anti-CD8 (clone Leu-2a) (BD Pharmingen). De plus il peut être parfois nécessaire d'éliminer les cellules mortes par gradient de ficoll (2 vol cellules: 1 vol Ficoll).

### **6.3. Test de prolifération.**

Ce test est réalisé par incorporation de [<sup>3</sup>H]thymidine. Des APC irradiées (2000 cellules) et la lignée cellulaire (20000 cellules) sont incubées, dans une plaque 96 puits à fond rond et dans un volume final de 200µl, en présence ou non de peptide HA<sub>306-318</sub> (1ng/µl) et ceci pour 72 heures, y compris les 16 dernières heures où la thymidine (1µCi/puit) (Amersham Pharmacia Biotech.) est ajoutée. Les cellules sont récoltées avec un « cell harvester » et l'incorporation de thymidine est mesurée avec un compteur à scintillation β (Pharmacia LKB, Gaithersburg, MD, USA). L'essai est réalisé en triplicata.

## **7. CYTOMÉTRIE EN FLUX.**

### **7.1. Coloration avec les tétramères.**

Les cellules T sont incubées avec les tétramères-PE dans un volume final de 15 µl de RPMI 1640, 10% FCS et ceci dans d'une plaque 96 puits à fond rond. Les expériences de mise au point de la coloration de cellules T par les tétramères ont joué sur les paramètres suivants: la concentration en tétramères (de 2.5 µg/ml à 120 µg/ml), le nombre de cellules T (de 10<sup>5</sup> cellules à 10<sup>6</sup> cellules), la température (37°C ou 4°C), et le temps d'incubation (de 1 heure à 5 heures). Les cellules sont ensuite incubées à 4°C pendant 30 minutes avec différents anticorps de surface (dilution 1:30). Ces anticorps étant directement couplés, les cellules sont incubées avec le mélange de tous les anticorps de surface désirés. Après deux lavages au PBS, les cellules sont resuspendues dans 300 µl du même tampon. Les cellules colorées sont analysées sur un FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) en utilisant les logiciels CellQuest (Becton Dickinson) ou FlowJo (TreeStar, Cupertino, CA, USA). 20000 évènements sont accumulés. Les cellules activées sont sélectionnées en focalisant sur les cellules vivantes en Forward Scatter et Side Scatter.

Pour les analyses cytométriques quatre couleurs, le négatif est ajusté au premier log en utilisant des cellules non colorées. Les compensations ont été réalisées en utilisant des cellules colorées avec un simple anticorps anti-CD4 couplé à -FITC, -PE, -PerCp ou -APC. Tous les contrôles isotypiques correspondants ont été faits en parallèle. Des cellules colorées uniquement avec la streptavidine ou avec un tétramère non spécifique sont incluses comme contrôle négatif.

## **7.2. Coloration intracellulaire.**

Les cellules T ( $2 \times 10^5$  cellules dans 200 $\mu$ l de milieu RPMI 10%FCS) sont incubées pendant 6 heures à 37°C dans une plaque 96 puits à fond plat : certains puits restent non stimulés, d'autres sont stimulés avec le peptide HA<sub>306-318</sub> à la concentration de 1 $\eta$ g/ $\mu$ l et d'autres sont traités avec la PHA (1mg/ml). De la brefeldin A (10 $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) est ajoutée dans les 5 dernières heures de stimulation, permettant ainsi l'accumulation des cytokines à l'intérieur de la cellule. Dans les cas où l'on veut faire une coloration avec les tétramères, les tétramères (20 $\mu$ g/ml) sont ajoutés dans les trois dernières heures de stimulation. Après les 6 heures de culture, les cellules sont transférées dans une plaque 96 puits à fond rond, lavées deux fois dans du PBS puis colorées pour les antigènes de surface d'intérêt. Les cellules sont alors lavées dans du PBS, fixées dans de la paraformaldéhyde 2% pendant 30 minutes, lavées avec du PBS puis incubées en présence de Saponine 0.5% (Sigma-Aldrich) pour 30 minutes. Un contrôle de perméabilisation est réalisé en colorant, avec le *perm-a-sure*, un puits traité à la Saponine et un puits non traité. Les anticorps intracellulaires sont alors ajoutés pour 30 minutes.

La coloration, la fixation et la perméabilisation sont réalisées à température ambiante.

## **7.3. Coloration avec le CFSE.**

Les cellules T, lavées deux fois avec du PBS, sont resuspendues dans un volume x de PBS à la concentration de  $2 \times 10^7$  cellules/ml et colorées avec un volume x de 5-

(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) pendant 8 minutes à température ambiante. Le CFSE est conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du DMSO, dégazé sous azote, et titré sur des PBMC afin de déterminer la concentration optimale et non toxique à utiliser (la concentration que l'on a utilisé dans nos expériences est de  $10\mu\text{M}$  soit une concentration finale de  $5\mu\text{M}$ ). La coloration est stoppée en neutralisant le CFSE libre avec deux volumes x de FCS froid. Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS et resuspendues dans du RPMI 1640, 10% sérum humain, et  $20\mu\text{g/ml}$  gentamycine. Les cellules sont alors stimulées avec  $1\mu\text{g/ml}$  de peptide et des PBMC irradiées à un ratio cellules T:APC de 1:1. Après trois jours de culture, les cellules sont colorées avec les tétramères et une combinaison d'anticorps de surface. Le niveau basal de prolifération est évalué avec des cellules non stimulées.

#### **7.4. Compétition de la liaison des tétramères au TCR avec des anticorps monoclonaux anti-CD4.**

Dans les expériences de compétition, les anticorps monoclonaux anti-CD4 ont été ajoutés à  $4^{\circ}\text{C}$  et 30 minutes avant la coloration avec les tétramères : trois concentrations ont été choisies (allant de  $0.01\mu\text{g/ml}$  à  $50\mu\text{g/ml}$  suivant les concentrations optimales pour chacun des anticorps, ces concentrations ayant été déterminées par titration sur des PBMC). Les cellules sont ensuite incubées avec les tétramères ( $10\mu\text{g/ml}$ ) pendant trois heures et ce à  $37^{\circ}\text{C}$  ou à  $25^{\circ}\text{C}$ . Dans une des expériences, les tétramères ont été ajoutés en même temps ou 3 heures avant les anticorps anti-CD4.

## **8. PRODUCTION ET PURIFICATION DES MONOMÈRES HLA-DR.**

### **8.1. Lipotransfection des cellules *Drosophila* Schneider 2 (S2).**

Les cellules S2 sont co-transfectées avec  $5\mu\text{g}$  de plasmide pCV-HLA-DR et  $0.6\mu\text{g}$  du vecteur pcophygro (136) exprimant le gène de résistance à l'hygromycine par la

méthode de lipofection en utilisant la lipofectine (Gibco-LifeTechnologies). Pour les transfections, les différents plasmides ont été préparés à partir de culture bactérienne de 30ml, l'ADN étant purifié uniquement par phénol-chloroforme. Brièvement, la veille de la transfection, quatre millions de cellules S2 en phase exponentielle sont mises en culture dans un 75cm<sup>2</sup> (Falcon) contenant 4 ml de milieu S&S, 1%FCS et 20µg/ml gentamycine. Vingt microlitres de lipofectine sont ajoutés à l'ADN dilué dans 180 µl de milieu S&S. Afin de permettre la formation des complexes liposome-ADN, il faut laisser incuber pendant 15 minutes à température ambiante. Les complexes sont alors déposés sur les cellules qui ont été transférées dans 1.8 ml milieu ne contenant pas de FCS. Vingt-quatre heures après la transfection les cellules sont mises dans 5 ml de milieu contenant 20% de FCS et quarante-huit heures après, l'agent de sélection (hygromycine à 315U/ml) est ajouté au milieu de culture.

Après trois semaines de sélection à l'hygromycine, les transfectants sont testés pour leur taux d'expression d'EGFP au FACS. Des clones individuels ont été sélectionnés pour leur haut taux d'expression (entre le deuxième et le troisième log) par tri cellulaire au FACS.

## **8.2. Production des molécules HLA-DR/peptide dans les cellules *Drosophila* Schneider 2 (S2).**

Les cellules S2 transfectées, avec nos diverses constructions, sont maintenues en culture dans du milieu Shields and Sang M3 (S&S) supplémenté avec 10% de FCS, 20µg/ml de gentamycine, l'agent de sélection hygromycine (315U/ml) et ce à une concentration relativement élevée (5 x 10<sup>6</sup> cellules/ml).

La production de protéines en grande quantité est réalisée dans un spinner flask (Bellco Glass, Vineland, NJ, USA), permettant ainsi une bonne aération, et dans du milieu SF900 serum-free (Gibco-LifeTechnologie). Quand la concentration cellulaire atteint les 10 x 10<sup>6</sup> cellules/ml et que le volume a été augmenté jusqu'à un litre, l'expression est induite par du sulfate de cuivre (1mM CuSO<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich). Les surnageants sont récoltés 5 jours après l'induction, centrifugés 15 minutes à

18600g et à 4°C (10000rpm sur une centrifugeuse Avanti™ J-20 XP, Beckman Coulter) et stockés à -20°C.

Pour conserver ces surnageants, on y ajoute un cocktail d'inhibiteurs de protéase- 0.7µg/ml de pepstatine (Calbiochem, San Diego, CA, USA), 1µg/ml de leupeptine (Calbiochem) et 0.1mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich)-, de l'azide de sodium 0.02% (NaN<sub>3</sub>) et de l'EDTA 0.5mM.

### **8.3. Purification des monomères.**

Les monomères sont purifiés à partir du surnageant par chromatographie d'affinité sur une colonne de protéine G Sepharose® 4 fast flow (Amersham Pharmacia Biotech.) couplée à l'anticorps monoclonal L243, ceci à un flux n'excédant pas 60ml/heure. Après passage du surnageant, la colonne est intensivement lavée avec du PBS. Les molécules accrochées à la colonne sont éluées avec 10ml de 3-[cyclohexylamino]-1-pro-panesulfonic acid (CAPS; 50mM, pH 11.5. Sigma-Aldrich) et les fractions collectées (800µl) sont neutralisées avec 200µl de Tris-HCl (0.5M, pH 7.5). Les fractions sont alors réunies et concentrées dans un Centricon® Plus-20 (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA); ceci permet également de dialyser la protéine en changeant le tampon avec du Tris-HCl 0.1mM, pH 8.3.

Le contenu protéique de la fraction finale est déterminé par Western blot (gel SDS/PAGE), la pureté est évaluée par gel de Coomassie et la concentration protéique est mesurée par microBCA, Bradford et/ou ELISA.

Les monomères sont conservés à -20°C avec de l'azide de sodium 0.02%.

### **8.4. Caractérisation biochimique et quantification des monomères HLA-DR/peptide.**

8.4.1. Détermination du contenu protéique par Western blot.

*Electrophorèse des protéines* : une quantité moyenne de 1µg de protéine est resuspendue dans un volume approprié de tampon de chargement (Tris-HCl pH 6.8



125mM; SDS 4%; glycérol 20%;  $\beta$ -mercaptoethanol 10%; bleu de bromophénol 5%) et dénaturée 2 min à 105°C.

Les protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide (12%). La migration est effectuée à 120V en utilisant un appareil électrophorétique Mini-PROTEAN II (Bio-Rad) jusqu'à sortie du front de migration.

*Electrotransfert des protéines sur membrane et western blot* : les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech.). La membrane est bloquée par incubation dans du PBST (PBS contenant 0.05% du détergent Tween 20) contenant 5% de lait. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire dans du PBST-lait toute la nuit à 4°C: l'anticorps polyclonal anti-MHC classe II (sérum de lapin) est utilisé à la dilution 1/200<sup>ième</sup>. Ensuite la membrane est lavée 3 fois (10 minutes) avec du PBST, puis incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin (dilution 1/1000<sup>ième</sup>) couplé à la peroxidase (Horse-radish peroxidase, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA) pendant une heure à température ambiante. La membrane est lavée trois fois avec du PBST pendant 10 minutes. Le marquage est révélé avec le réactif luminogène ECL (Mandel, Mississauga, Qc) puis exposé au contact d'un film Kodak.

#### 8.4.2. Détermination de la pureté et quantification par gel de coomassie.

Suite à leur migration sur un gel de polyacrylamide (12%), les échantillons sont révélés par une coloration au bleu de coomassie. Pour la coloration, le gel a été trempé pendant 30 minutes sous agitation modérée dans une solution filtrée de méthanol(45%)/ H<sub>2</sub>O(45%)/ acide acétique glacial(10%) contenant 0.25g de Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue (Sigma-Aldrich). La décoloration du gel se fait dans une solution de méthanol(30%)/ H<sub>2</sub>O(60%)/ acide acétique glacial (10%).

La quantification se fait en utilisant comme standard différentes concentrations de BSA-Fraction V (Roche Diagnostic, Laval, Qc): la concentration estimée est déterminée par le logiciel Imagequant.

#### 8.4.3. Quantification par Bradford, microBCA et/ou ELISA.

La concentration protéique peut-être déterminée par la méthode de Bradford, un kit (Bio-Rad) basé sur la coloration au Coomassie® Brilliant Blue des acides aminés basiques et aromatiques ( $DO_{595nm}$ ) et qui utilise la BSA comme protéine standard.

Le kit BCA (Pierce, Rockford, IL, USA), basé sur la réaction de Biuret, permet de détecter et de quantifier de façon colorimétrique ( $DO_{562nm}$ ) nos monomères HLA-DR/peptide, toujours en utilisant comme courbe standard la BSA.

Une autre technique qui nous est accessible est le test ELISA. L'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal de lapin anti-DR $\alpha$  ou anti-DR $\beta$  à une dilution de 1/100<sup>ième</sup>. L'anticorps secondaire, le L243 utilisé à une dilution de 1/300<sup>ième</sup>, est révélé par un anticorps chèvre anti-souris couplé à la biotine (Dilution 1/1000<sup>ième</sup>; Kirkegaard&Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). La peroxidase couplée à la Streptavidine (Dilution 1/2000<sup>ième</sup>; Dako Diagnostics Canada Inc, Mississauga, ON) permet de quantifier de façon colorimétrique ( $DO_{405nm}$ ) nos protéines. Le standard utilisé est un échantillon de HLA-DRB\*0101 purifié et quantifié de façon précise.

## 9. PRÉPARATION DES COMPLEXES TÉTRAMÉRIQUES HLA-DR/peptide.

### 9.1. Biotinylation des monomères HLA-DR/peptide.

Les molécules purifiées de MHC classe II sont biotinylées en utilisant l'enzyme BirA (Avidity, Denver, CO, USA) suivant les instructions du manufacturier. En résumé, les monomères (en concentration assez élevée soit environ 2mg/ml) sont incubés avec 20ug/ml d'enzyme BirA pendant 16 heures à 37°C dans le tampon suivant: Tris-HCl (10mM, pH 8), Bicine (50mM, pH8.3), ATP (10mM), Mg acetate (10mM), et biotine (40 $\mu$ M).

La biotine libre est éliminée par centrifugation sur un Centricon® Plus-20 (Amicon Canada Ltd) et le tampon est échangé avec du PBS.

## **9.2. Quantification du taux de biotinylation.**

Le taux de biotinylation est évalué par ELISA en utilisant le kit BRTA (Avidity). C'est un kit qui détecte de façon colorimétrique ( $DO_{405nm}$ ) les molécule biotinylées en utilisant la peroxidase couplée à l'avidine. La protéine standard fournie est la MBP biotinylée. Typiquement le taux de biotinylation obtenu est de 95%.

## **9.3. Tétramérisation.**

Les complexes tétramériques sont préparés en ajoutant, par étape, sur les monomères biotinylés de la streptavidine couplée à la phycoérythrine (Biosource, Camarillo, CA, USA) pour obtenir un ratio molaire de 1:4 (streptavidine-PE:Classe II biotinylé). La concentration du stock de tétramères est de  $120\eta g/\mu l$ , ce stock étant conservé à 4°C.

# RÉSULTATS

## 1. PRODUCTION, PURIFICATION, CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET QUANTIFICATION DES COMPLEXES HLA-DR/peptide.

*Production des protéines HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401.*

- Transfection des cellules d'insectes *drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2).

Les cellules S2 sont transfectées par lipofection. La lipofection est un protocole qui utilise un lipide synthétique cationique (le DOTMA ou N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride) qui forme de petits liposomes unilamellaires qui capturent spontanément l'ADN formant ainsi des complexes liposome/ADN. Il y a alors fusion de ces complexes avec la membrane cellulaire et donc libération de l'ADN directement dans le cytoplasme des cellules. C'est une méthode extrêmement reproductible et efficace: notre taux de réussite est de 100%.

- Culture des cellules S2.

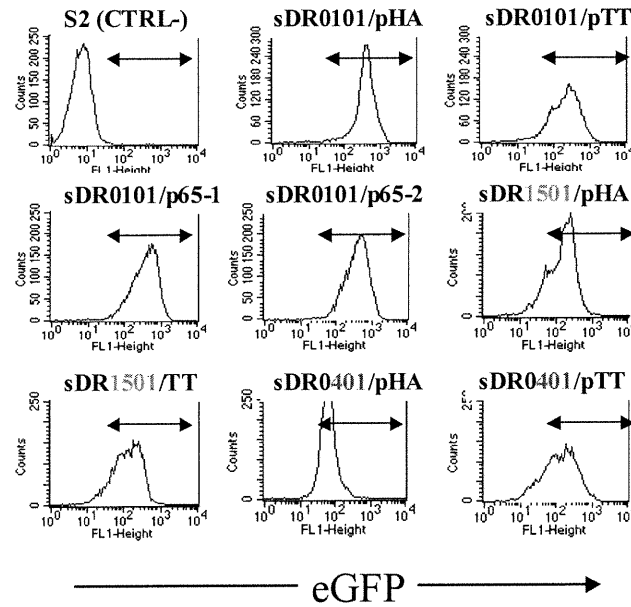
Les cellules S2 poussent à 26°C dans une atmosphère où le taux de CO<sub>2</sub> et l'humidité ne sont pas contrôlés. Ce sont des cellules qui adhèrent très faiblement (elles sont décollables par simple agitation à la pipette); une fois transfectées, elles gardent cette propriété. Les cellules S2, qui ont été transfectées avec toutes nos constructions, sont mises en culture dans du milieu S&S contenant de l'hygromycine (rappelons que le plasmide pcohygro, portant le gène de résistance à l'hygromycine, est co-transfecté avec le plasmide pCV afin d'établir des lignées stables). La quantité d'antibiotique à utiliser a été déterminée par dose-réponse sur des cellules transfectées et cultivées dans le milieu S&S. Au bout de trois semaines, période pendant laquelle on observe une mort cellulaire très importante, des cellules hygromycine-résistante commencent à pousser. Les cellules résistantes sont d'abord mises en culture dans des petits flasques puis transférées dans des "spinner flask", lorsque la concentration cellulaire est assez élevée (5 millions/ml). Ces flasques maintiennent les cellules sous agitation constante, et

donc en suspension, et permettent donc une bonne aération. La culture ne doit pas excéder 1/3 de la flasque. Les cultures mères sont gardées en petite flasque et seule la production se fait en “spinner flask” (l’agitation permanente fragilise les cellules et ne permet pas de les maintenir en culture). Les S2 transfectées ont un temps de doublement de 24-48 heures et leur densité peut atteindre 15 millions de cellules /ml. Ces cellules peuvent rester en culture pendant des mois ce qui permet d’avoir une production continue et évite d’avoir à congeler et décongeler des transfectants en permanence. Il est normalement préférable de produire les protéines dans un milieu sans sérum, les protéines sériques interférant avec les processus de purification en aval de la production. Mais bien que les milieux “serum-free” soient adaptés et optimisés pour ce type de cellules et de système d’expression, il était difficile d’y faire pousser les cellules S2 à une concentration cellulaire dense. Nous avons donc opté pour du milieu S&S supplémenté avec 10% de FCS.

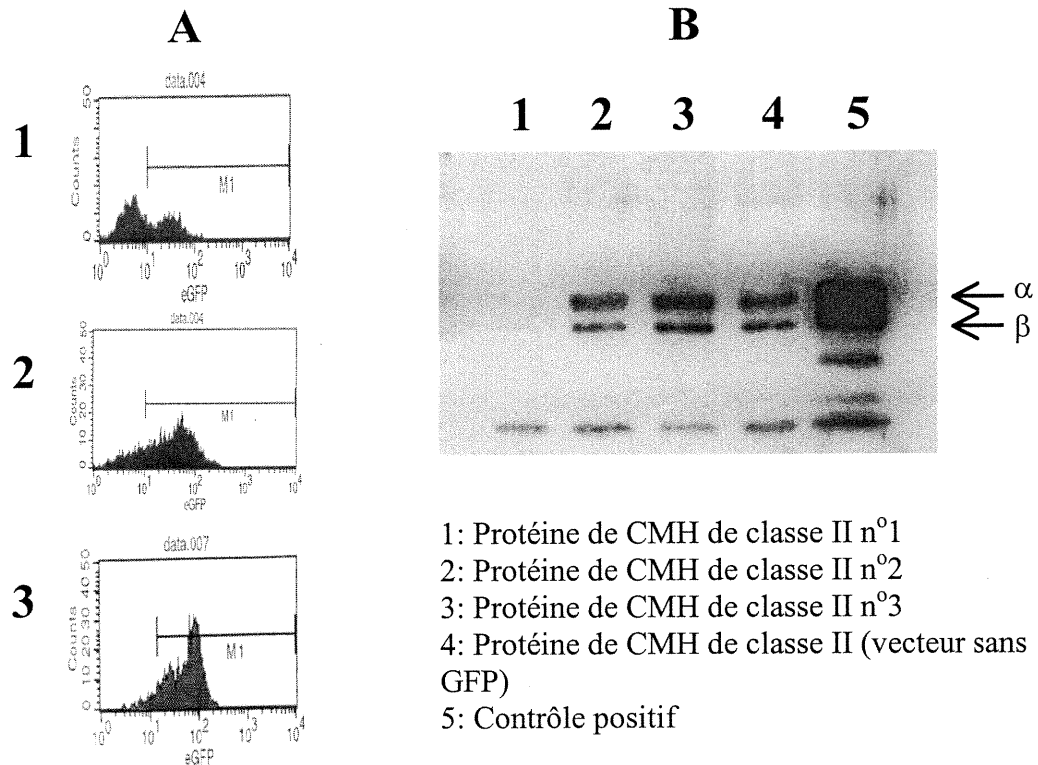
L’induction de la production se fait par le cuivre et ne doit pas excéder 5 jours, le cuivre devenant toxique au delà de cette limite, causant ainsi la mort des cellules qui libèrent alors des protéases qui vont dégrader nos protéines.

- Niveau d’expression des transfectants.

Le niveau d’expression de nos protéines est évalué par le taux de GFP. On mesure donc de façon régulière le niveau d’expression de la GFP au FACS. La fluorescence se stabilise, pour à peu près tous les transfectants, entre le deuxième et le troisième log (Figure 12). Au début de nos travaux, le taux de GFP a été corrélé avec l’expression en DR (détectée par Western blot) (Figure 13). Des essais de tri cellulaire pour sélectionner des clones forts en GFP ont été faits mais sans succès: les cellules semblent mal résister à la pression du FACS et meurent lors du tri (Données non montrées).



**FIGURE 12.** Taux d'expression de GFP dans les cellules S2 transfectées avec différentes molécules recombinantes HLA-DR/peptide.



**FIGURE 13.** Corrélation entre le le taux de GFP (A) et l'expression en molécules de CMH de classe II détectée par Western blot (B) pour trois différents transfectants.

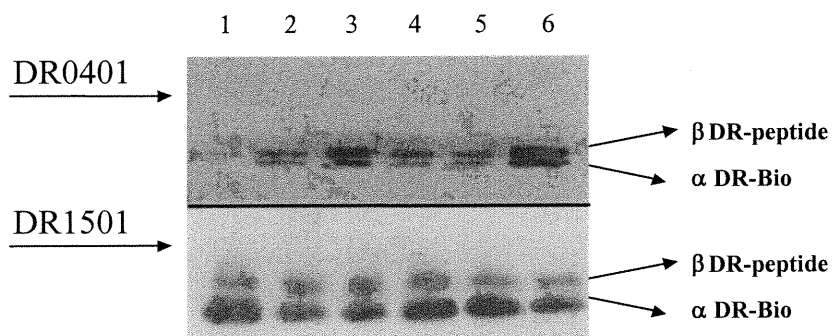
*Purification des protéines recombinantes HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401.*

Nos protéines sont purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne de « CNBr-activated Sépharose™ 4B » couplée au L243. Le L243 est un anticorps qui reconnaît un épitope monomorphique de la chaîne DR $\alpha$  et permet donc d'éluer toutes nos constructions sans aucune restriction. Une colonne est faite avec 10 mg de L243 ce qui permet de capter environ 5 mg de DR. Par contre elle devient inutilisable au bout de 25 passages (ou 25 litres) car elle est saturée en protéines non spécifiques (provenant, entre autres, du sérum). En général, le volume des cultures est de 1 litre ce qui nous donne environ 0.5mg de protéines/litre de culture. Le tout peut donc être capté par la colonne en un seul passage.

*Caractérisation biochimique des protéines recombinantes HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401.*

- Western blot sur les molécules HLA-DR0101, HLA-DR1501 et HLA-DR0401 (Figure 14 et 15).

Nous avons vérifié par Western blot, après purification par chromatographie d'affinité sur colonne L243 des différents surnageants, que nous avons bien deux bandes correspondant à la chaîne  $\alpha$  et à la chaîne  $\beta$  pour chacune de nos molécules.



**FIGURE 14.** *Analyse en Western blot des complexes HLA-DR1501/peptide et HLA-DR0401/peptide.* La ligne 1 correspond à la molécule vide, la ligne 2 au peptide HA, la ligne 3 au peptide TT, la ligne 4 au peptide pp65-1, la ligne 5 au peptide pp65-2 et la ligne 6 au peptide IE1. Le Western blot est révélé avec un sérum de lapin anti-

CMH class II. Les protéines sont migrées sur un gel de polyacrylamide 12% après dénaturation.

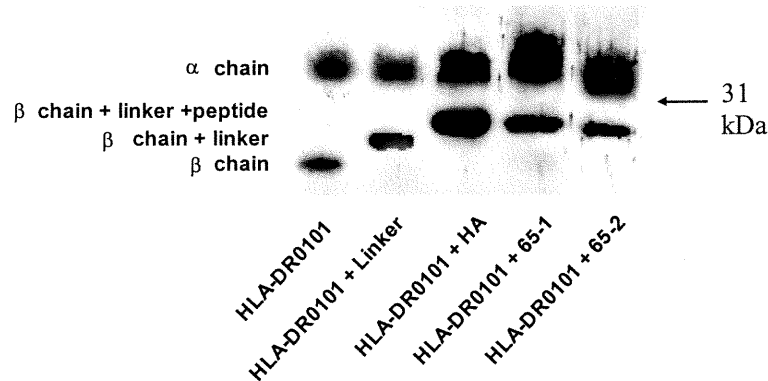


FIGURE 15. Analyse en Western blot de différents complexes HLA-DR0101.

- Détermination de la stabilité SDS des molécules recombinantes HLA-DR.

L'analyse en gel SDS-PAGE de nos molécules recombinantes, après purification sur colonne de chromatographie, dans des conditions dénaturantes (les échantillons étant bouillis à 105 °C pendant 2 minutes) nous montrent deux bandes qui correspondent à la taille attendue pour la chaîne  $\alpha$  (29 kDa) et la chaîne  $\beta$  (31 kDa). Ces mêmes échantillons préparés dans des conditions non dénaturantes et non réductrices apparaissent sous deux formes: une première forme compacte qui migre vers 56 kDa et les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la molécule de classe II dissociée. La présence de la forme compacte nous indique que la molécule de classe II est mature fonctionnellement et structurellement et que le peptide est bien logé dans la poche peptidique. De plus la protéine recombinante correspond à la bande majoritaire sur le gel coloré au coomassie: on constate que l'on a une fraction pure (Données non montrées).

- Coloration de cellules DAP-3 transfectées avec le complexe membranaire HLA DR0101/HA<sub>306-318</sub> pour s'assurer de l'expression à la surface des molécules de classe II.

On est capable de détecter par analyse au FACS et avec l'anticorps monoclonal L243 des molécules de classe II à la surface des cellules DAP-3 (Données non



montrées). Étant donné que le L243 reconnaît un épitope conformationnel de la molécule de classe II, on peut affirmer que nos molécules liant de façon covalente le peptide ont une bonne conformation.

*Quantification des protéines recombinantes HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401 à toutes les étapes de la production de tétramères.*

Le point fort de notre système est que chaque étape de la production de tétramères est contrôlée par un test de quantification et/ou de conformation de la molécule:

- (1) Après purification sur colonne de chromatographie des surnageants, un gel de stabilité SDS peut être réalisé pour confirmer la bonne conformation de nos molécules.
- (2) Les fractions purifiées sont alors quantifiées sur gel de Coomassie, par des techniques colorimétriques comme le microBCA ou Bradford, par Western blot et par ELISA avec l'anticorps L243. Le standard utilisé pour les deux premières techniques est la BSA alors que pour les deux dernières il s'agit d'une molécule de CMH de classe II pure et quantifiée. La combinaison de toutes ces techniques nous permet d'avoir une évaluation très précise de la quantité de monomères dont nous disposons.
- (3) On évalue le taux de biotinylation par un test ELISA détectant la biotine. On a en règle générale des taux de biotinylation autour de 80-90%.

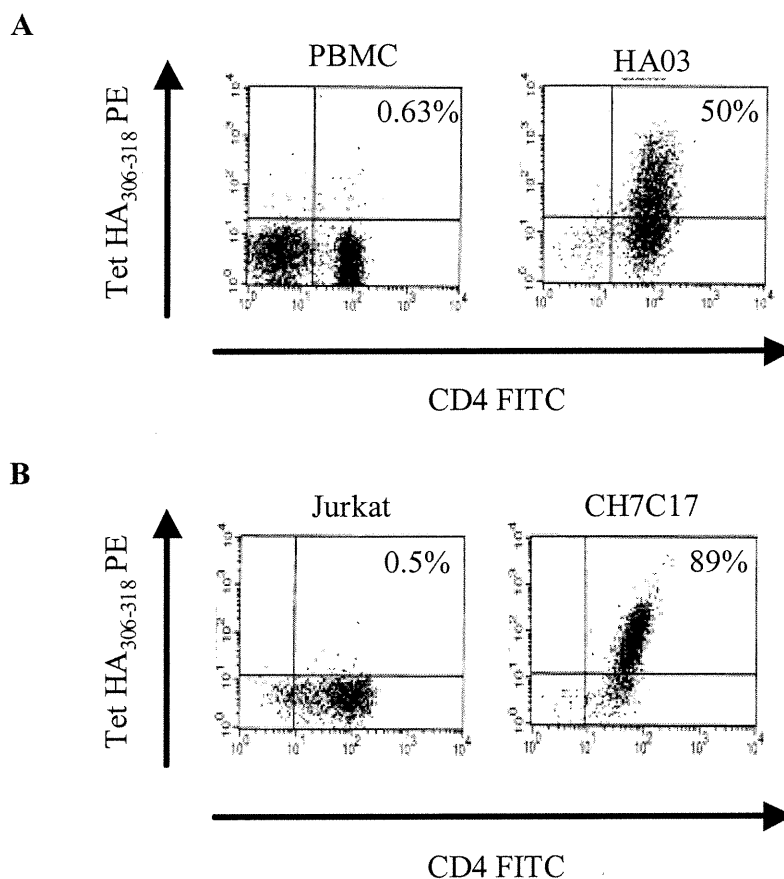
## **2. ÉVIDENCES DE LA SPÉCIFICITÉ DE LA LIAISON DU COMPLEXE TÉTRAMÉRIQUE HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> AU TCR.**

*Liaison spécifique du complexe tétramérique HLA-DR0101/HA sur la lignée cellulaire HA03 et sur le clone T CD4<sup>+</sup> CH7C17 (Figure 16).*

Pour valider la spécificité de nos tétramères, nous avons généré une lignée spécifique du peptide HA<sub>306-318</sub> présenté dans le contexte HLA-DR0101. C'est une lignée obtenue à partir de PBMC d'un individu HLA-DRB1\*0101, -DRB1\*1101 et dont la spécificité a été contrôlée par test de prolifération (données non montrées). Nous avons également utilisé un clone jurkat CH7C17, transfecté avec un unique

TCR spécifique du complexe HLA-DRB1\*0101/HA<sub>306-318</sub> (TCR constitué de la chaîne  $\alpha$  jurkat et de la chaîne  $\beta$  du clone HA1.7)(134). La lignée HA03 et le clone CH7C17 sont colorés pendant 3 heures à 37°C avec le tétramère spécifique HLA-DR0101/HA. Des contrôles, incluant des PBMC du même donneur que celles qui ont servi à générer la lignée et des jurkat non transfectées par le TCR HA1.7, sont colorés de la même manière. Ce test de coloration montre que l'on détecte environ 90 % de cellules spécifiques de HA<sub>306-318</sub> pour le clone CH7C17. Pour la lignée HA03, 50% des cellules sont spécifiques de HA<sub>306-318</sub>: c'est en effet le maximum espéré car c'est une lignée jeune (trois semaines de stimulation) et générée à partir de PBMC d'un individu hétérozygote dont seules 50% des cellules sont restreintes par HLA-DRB1\*1101. Les PBMC contiennent 0.63% de cellules tétramères positives ce qui correspond à la fréquence des précurseurs que l'on peut espérer trouver dans des cellules du sang périphérique (sachant en outre que ces PBMC ont permis de générer une lignée). Il en est de même pour la lignée Jurkat où 0.5% des cellules sont tétramères positives. Ces résultats sont en accord avec d'autres études où des clones ont été colorés avec des tétramères et confirment la spécificité de nos tétramères.

NB: la lignée HA03, bien que ce soit une lignée jeune (elle a subi seulement trois ou quatre cycles de restimulation) est déjà presque 100% CD4<sup>+</sup> ce qui est un argument de plus pour dire qu'elle est bien HA<sub>306-318</sub> spécifique et que nos tétramères peuvent détecter ces clones.



**FIGURE 16.** *Spécificité de l'interaction tétramère HLA-DR0101/HA avec le TCR.* La lignée HA03 (A) et le clone jurkat CH7C17 (B), spécifiques du complexe HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>, sont incubés pendant 3 heures à 37°C avec des tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> (20µg/ml) puis pendant 30 minutes à 4 °C avec l'anti-CD4 FITC. Des PBMC (A) et des jurkat (B) sont colorées de la même façon afin de mesurer le taux basal de liaison du tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> au TCR.

*Détection de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques de HA<sub>306-318</sub> diluées dans des PBMC avec le tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>.* (Figure 17).

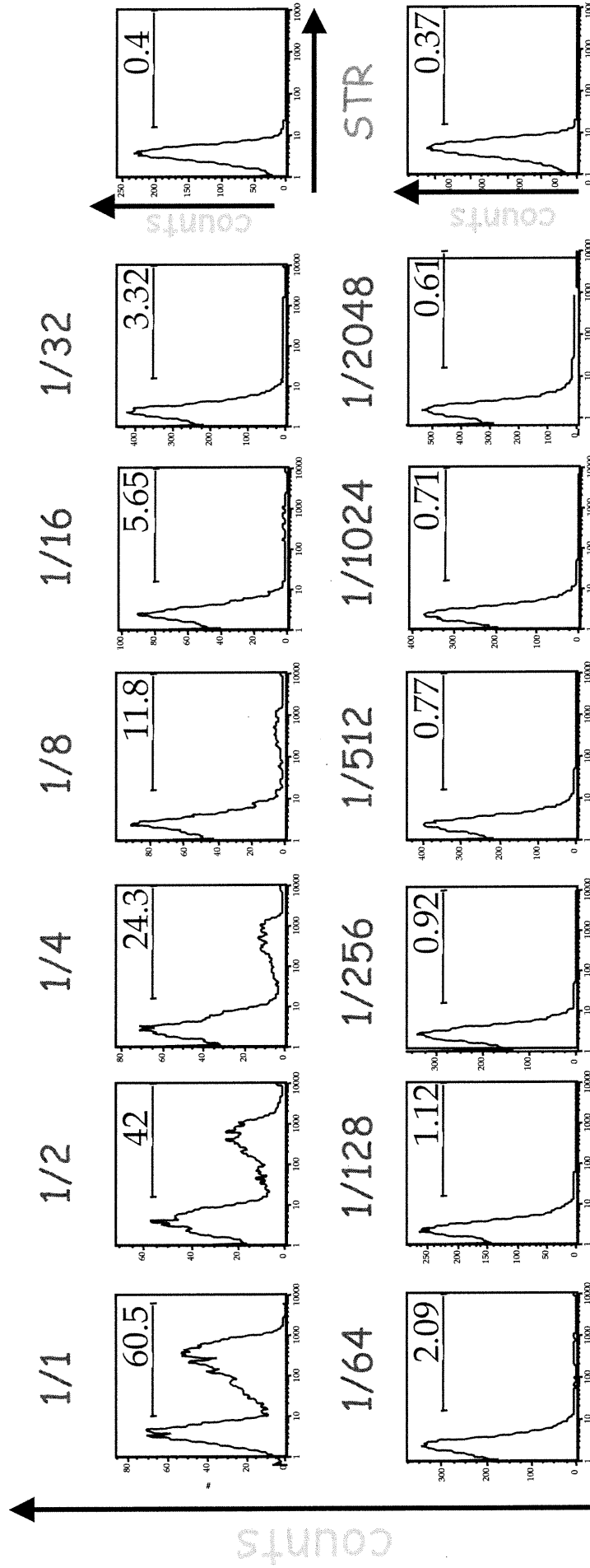
Pour à nouveau confirmer la spécificité de la liaison de nos tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> au TCR, une série de dilutions de la lignée HA03 avec des PBMC (non spécifiques de HA<sub>306-318</sub>) du même donneur ont été réalisées. Le pourcentage de cellules détectées par les tétramères correspond au nombre attendu en fonction du facteur de dilution. La lignée seule comporte 60% de cellules spécifiques de HA<sub>306-318</sub> (c'est une lignée qui a subi plus de trois cycles de restimulation et qui est donc

enrichie en clones HLA-DR0101). À chaque facteur de dilution 2, le pourcentage de cellules spécifiques de HA<sub>306-318</sub> diminue de moitié. Au delà d'une dilution 1/1000, on a des valeurs de cellules positives qui correspondent au niveau basal donné par la streptavidine seule ou un tétramère présentant un peptide autre que le peptide HA<sub>306-318</sub>. Nos tétramères sont donc vraiment spécifiques et il est possible de détecter des populations dont la fréquence est de l'ordre de 0.25%.

*Corrélation entre la liaison des tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> sur la lignée cellulaire HA03 et la fonction effectrice de ces mêmes cellules (Figure 18).*

Pour voir si la fréquence de cellules détectées par les tétramères peut être corrélée avec la fonction effectrice de ces mêmes cellules, nous avons mesuré la production d'IFN- $\gamma$ , après stimulation avec le peptide antigénique HA<sub>306-318</sub> pendant 6 heures, de la lignée HA03 que l'on a ensuite colorée avec les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>. Dans le cas de la lignée HA03 non stimulée, on détecte environ 42% de cellules tétramères positives et seulement 1.35% de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$ . Après stimulation peptidique, on observe 22% de cellules tétramères positives et 21 % de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  (ce qui correspond aux 42% de cellules détectées par les tétramères dans la condition "non stimulé"). Il est cependant surprenant de voir que l'on n'a pas 42% de cellules tétramères positives et sécrétant de l'IFN- $\gamma$ . Ces résultats indiquent que, dans une lignée qui est restimulée de façon constante, toutes les cellules colorées par les tétramères ne sont pas forcément des cellules potentiellement effectrices. De plus, le fait que toutes les cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  ne soient pas détectées par les tétramères ne remet pas en cause la validité de notre outil: on peut en effet penser qu'après 6 heures de stimulation antigénique à 37°C, il y a eu internalisation du TCR, notamment pour les clones les plus affins (c'est pourquoi il y aurait très peu de cellules Tet<sup>+</sup>- les tétramères ayant été ajoutés après les 6 heures de stimulation- avec une fluorescence très élevée qui serait le signe d'une forte affinité) et produisant le plus d'IFN- $\gamma$ .

# HA03/PBMCs

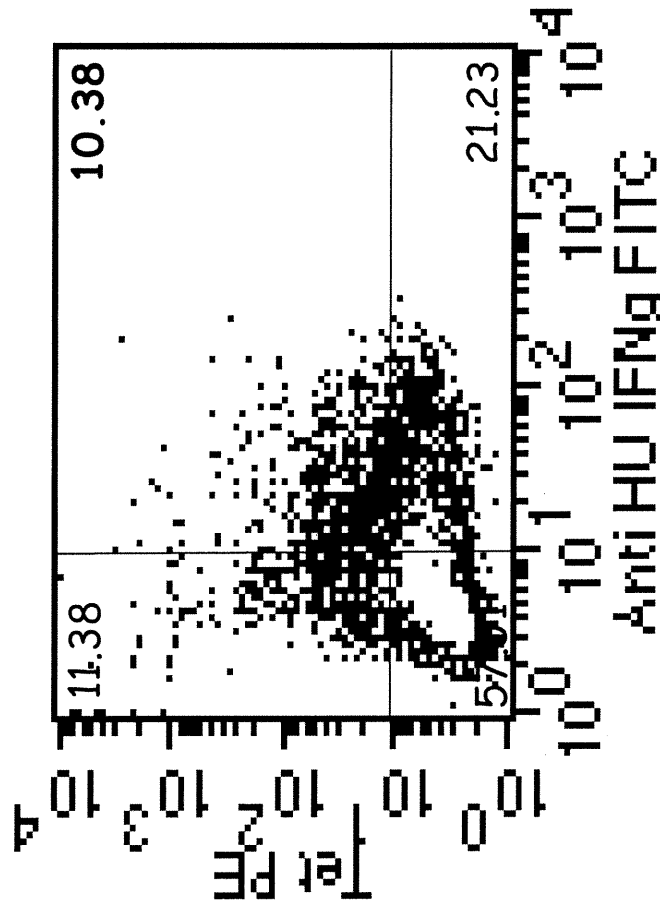
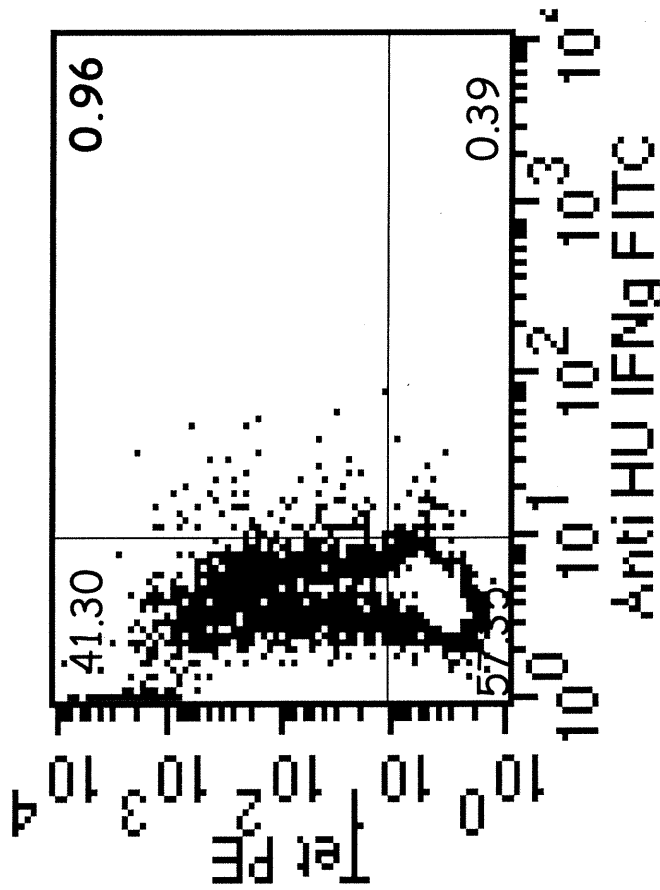


# Tet HA<sub>306-318</sub> PE

**FIGURE 17. Spécificité et limite de détection des tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>.** La lignée HA03 est diluée avec des PBMC non spécifiques de HA<sub>306-318</sub> aux facteurs de dilution indiqués. Les cellules sont colorées avec les tétramères (60µg/ml) pendant 3 heures à 37°C puis incubées avec l'anti-CD4 FITC pour 30 minutes à 4°C. Ces histogrammes sont faits sur les cellules vivantes CD4<sup>+</sup>.

Non stimulé

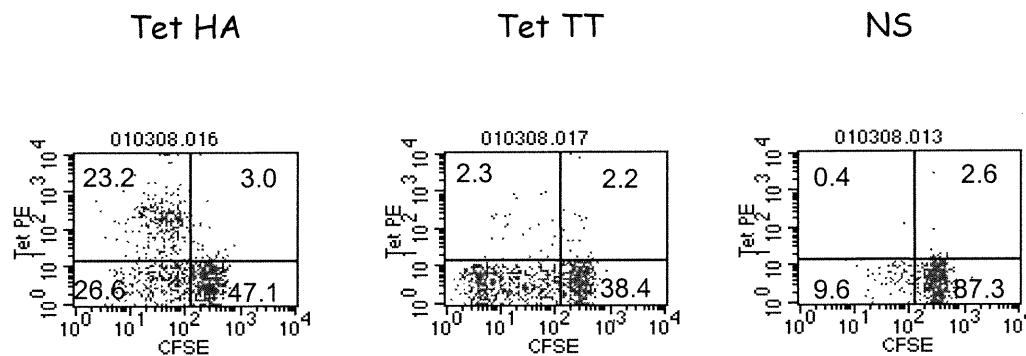
HA<sub>306-318</sub>



**FIGURE 18.** Relation entre la fonction effectrice de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du peptide HA<sub>306-318</sub> et la liaison du tétramère HLA-DR/HA<sub>306-318</sub> au TCR. Au jour 7 après la dernière restimulation, la lignée HA03 est stimulée pendant 6 heures et à 37°C (en présence de Brefeldin A) avec le peptide HA<sub>306-318</sub> (1  $\mu$ g/ml) et coloré avec les tétramères (20  $\mu$ g/ml) dans les trois dernières heures de stimulation. Après perméabilisation des cellules, le marquage intracellulaire de l'IFN- $\gamma$  est réalisé. Tous les graphes sont faits sur les cellules vivantes CD4<sup>+</sup>.

*Détection par tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> de cellules prolifératives en réponse à une stimulation antigénique avec le peptide HA<sub>306-318</sub> (Figure 19).*

Des cellules HA03 (2.5%) sont diluées dans des PBMC du même donneur. Ces cellules, colorées au CFSE, sont stimulées avec le peptide HA<sub>306-318</sub>. Au bout de sept jours de stimulation, les cellules sont colorées avec le tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>. La lignée prolifère en réponse à la stimulation antigénique comme on peut le voir par la diminution de la fluorescence pour le CFSE (Le CFSE est un colorant intracellulaire dont la quantité est partagée entre les deux cellules filles à chaque division cellulaire). On détecte 20% de cellules CFSE<sup>bas</sup>. La plupart des cellules tétramères positives ont proliféré. On remarque également une prolifération des cellules Tet<sup>-</sup> non négligeable qui pourrait être expliquée par une prolifération non spécifique due à la production d'IL-2 par les cellules CD4. Nos tétramères permettent donc d'identifier des cellules qui prolifèrent en réponse à un antigène.

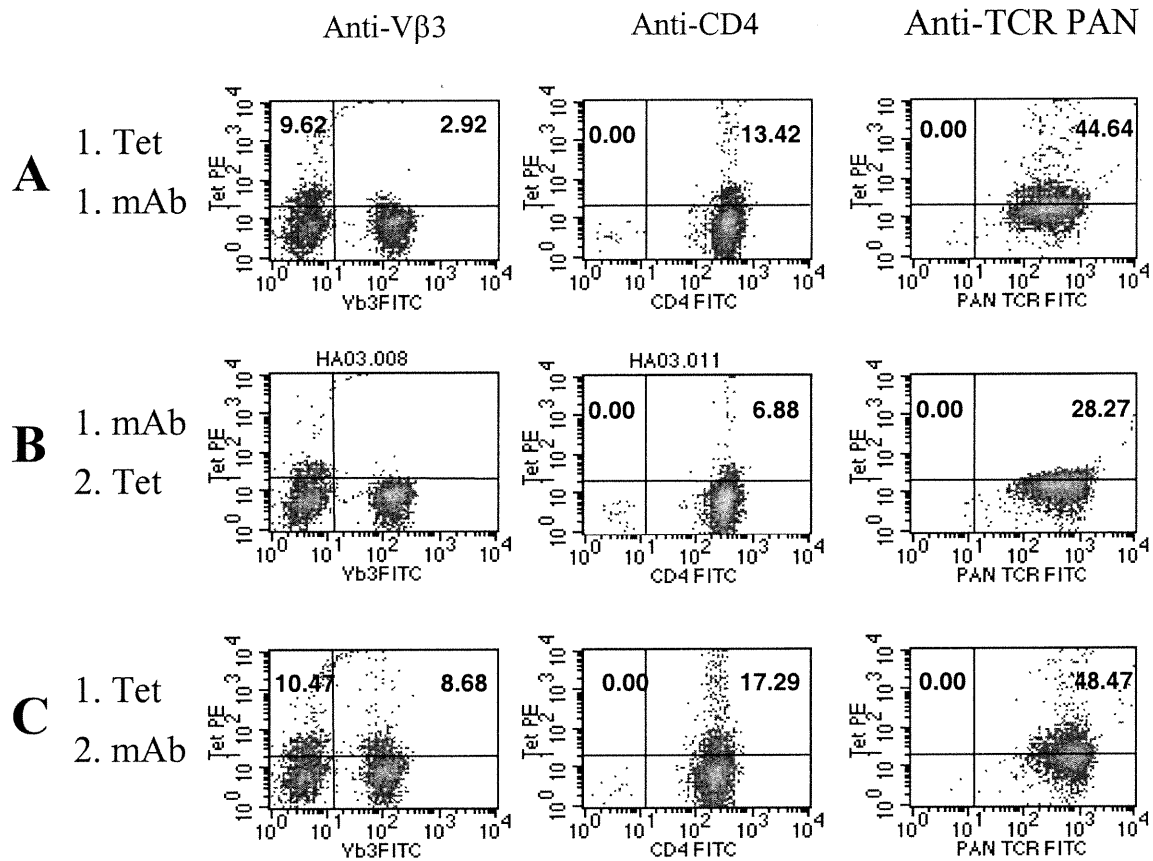


**FIGURE 19.** *Identification par tétramères de cellules HA03 qui prolifèrent en réponse à une stimulation avec le peptide HA<sub>306-318</sub>. La lignée HA03, colorée au CFSE et stimulée avec (a) le peptide HA<sub>306-318</sub> (1µg/ml) (b) le peptide TT<sub>830-843</sub> (c) ou non stimulée pendant 7 jours, est marquée avec les tétramères (20µg/ml) pendant trois heures à 37°C. Les cellules, colorées avec un anti-CD4 PerCP 30 minutes à 4°C, sont ensuite analysées au FACS en focalisant sur les cellules CD4<sup>+</sup> vivantes.*

*Compétition de l'interaction du tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> avec le TCR par des anticorps anti-TCR et anti-CD4 (Figure 20).*

Pour valider la spécificité de la liaison de nos tétramères au TCR, nous avons observé l'effet d'anticorps anti-TCR et anti-CD4 sur la liaison du tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> aux TCR de la lignée HA03. Étant donné que les interactions TCR/CMH-peptide sont dynamiques et qu'un complexe CMH-peptide se dissocie et s'associe au TCR continuellement, il était important de déterminer l'ordre dans lequel les tétramères et des anticorps monoclonaux (mAb) doivent être incubés pour obtenir le pourcentage de compétition maximal. Trois conditions ont été testées: (1) incubation pendant trois heures des tétramères et des mAb, (2) incubation pendant 30 minutes des mAb puis ajout des tétramères pendant trois heures et (3) incubation pendant trois heures des tétramères avant ajout des mAb (30 minutes). Tous ces tests ont été réalisés à 25°C, température faisant un compromis entre la température optimale de la liaison du tétramère (37°C car c'est à cette température que la constante de dissociation de l'interaction du complexe CMH-peptide et du TCR reflète le plus l'affinité du tétramère pour le TCR) et celle des mAb (4°C pour éviter l'internalisation des récepteurs). Les mAb utilisés sont (a) un anticorps anti-TCR PAN (qui reconnaît un épitope monomorphique commun à tous les TCR), (b) un anticorps anti-Vβ3 (qui reconnaît un épitope des cellules T ayant réarrangé la région variable Vβ3) car le répertoire sélectionné par le complexe HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> est majoritairement Vβ3 et (c) un anticorps anti-CD4, clone Leu3a, qui reconnaît un épitope du domaine D1 du CD4. Dans tous les cas de figure, quand les tétramères sont incubés après les mAb on obtient des pourcentages d'inhibition plus importants que dans les deux autres approches. Bien que les anticorps aient des affinités beaucoup plus importantes pour le TCR ou le CD4 que le complexe CMH-peptide ( $10^{-15}$ M contre  $10^{-7}$ M), c'est quand les tétramères sont mis en premier que l'on a le moins de compétition: l'avidité gagnée par la tétramérisation permet à la liaison tétramère-TCR de résister à la compétition avec les mAb. Nos données ont donc montré que la liaison du tétramère au TCR est bloquée par des mAb anti-TCR et anti-CD4 et que la meilleure inhibition est obtenue quand la coloration avec les anticorps anti-TCR et anti-CD4 précède la liaison des tétramères.





**FIGURE 20.** *Inhibition de la liaison du tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> au TCR par des anticorps monoclonaux anti-TCR et anti-CD4.* La lignée HA03 est incubée pendant 3 heures à 25°C avec des tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> (10µg/ml) avec ou sans anticorps anti-TCR PAN, anti-Vβ3 et anti-CD4. En (A), les tétramères et les mAb (25µg/ml) sont incubés simultanément pour trois heures. En (B), les mAb (25µg/ml) sont d'abord incubés pour 30 minutes puis les tétramères sont ajoutés pour trois heures. En (C), les cellules sont d'abord incubées avec les tétramères pour trois heures puis avec les mAb (25µg/ml) pour 30 minutes.

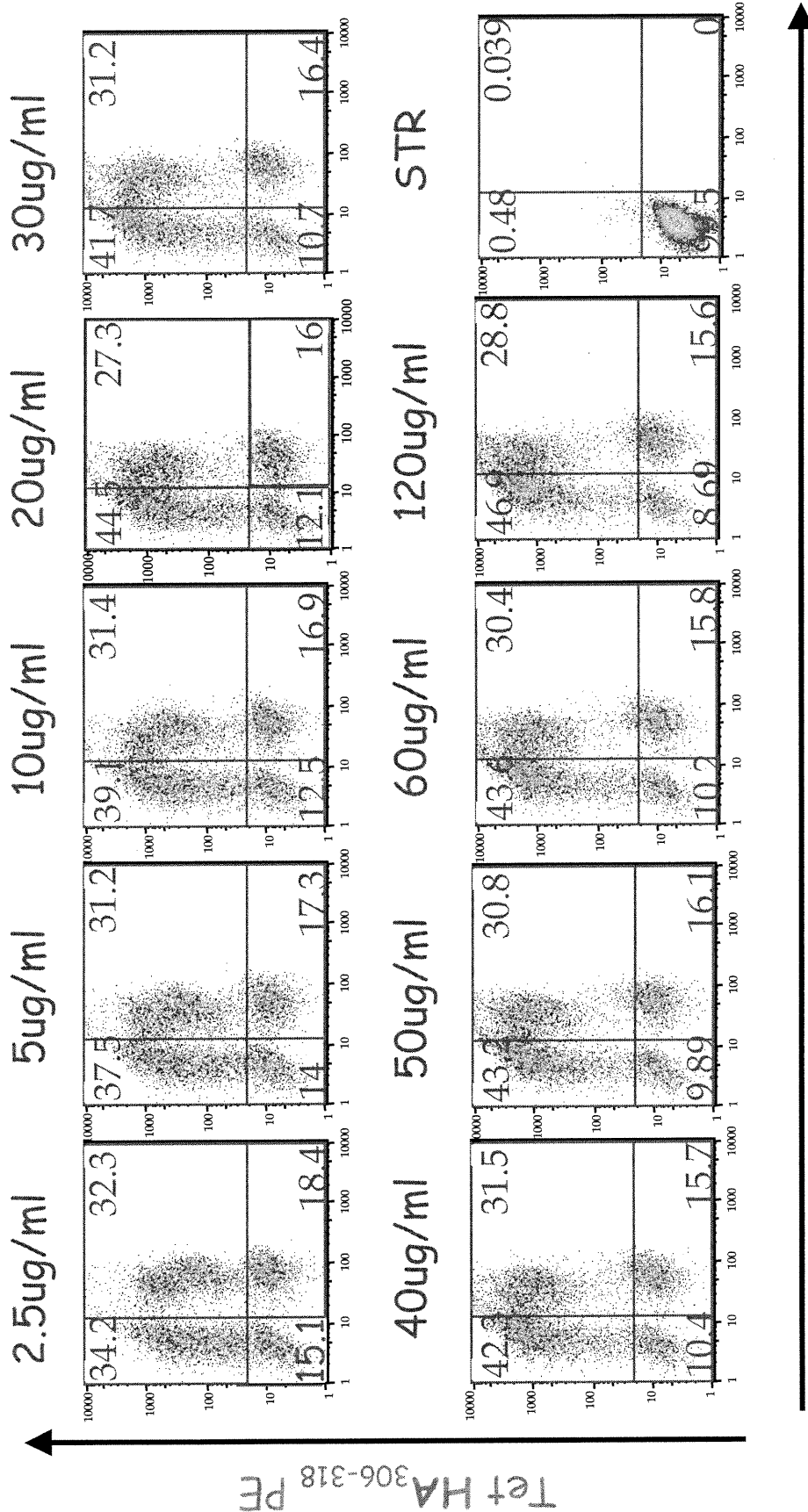
### 3. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE COLORATION DE CELLULES T CD4<sup>+</sup> PAR LE TÉTRAMÈRE HLA-DR0101/PEPTIDE.

*Effet de la concentration en tétramères sur la coloration de la lignée cellulaire HA03 spécifique du peptide HA<sub>306-318</sub> (Figure 21).*

La coloration de la lignée HA03 avec des doses croissantes de tétramères (2.5µg/ml à 120µg/ml) nous a montré que l'on était capable de détecter des cellules spécifiques de HA<sub>306-318</sub> avec une concentration de tétramères aussi faible que 2.5µg/ml: en effet le pourcentage de cellules tétramères positives reste le même (environ 70%) quelle que soit la concentration utilisée. Par contre, à faible concentration de tétramères (2.5µg/ml), la coloration de la lignée nous permet de différencier plusieurs populations ayant une affinité différente pour les tétramères. À forte concentration en tétramères, il n'est plus possible de séparer les populations tétramères<sup>haut</sup> et tétramères<sup>bas</sup>: les populations tétramères<sup>bas</sup>, de plus faible affinité, sont alors saturées par les tétramères. La concentration 20µg/ml est déjà une concentration saturante: des doses supérieures de tétramères ne permettent pas d'augmenter le niveau de fluorescence des cellules tétramères positives. Il est aussi important de noter qu'en augmentant la concentration de tétramères, on voit la fluorescence des cellules Vβ3<sup>+</sup> Tet<sup>+</sup> diminuer pour le Vβ3. On peut donc imaginer que les tétramères sont internalisés avec le TCR après qu'ils aient interagis ensemble. La coloration avec l'anticorps anti-Vβ3 se faisant après l'incubation avec les tétramères, il y a moins de récepteurs TCR pouvant être marqués par le mAb anti-TCR. Une autre hypothèse est qu'il y a encombrement stérique. On pourrait s'en assurer en regardant si le CD3 est internalisé ou non.

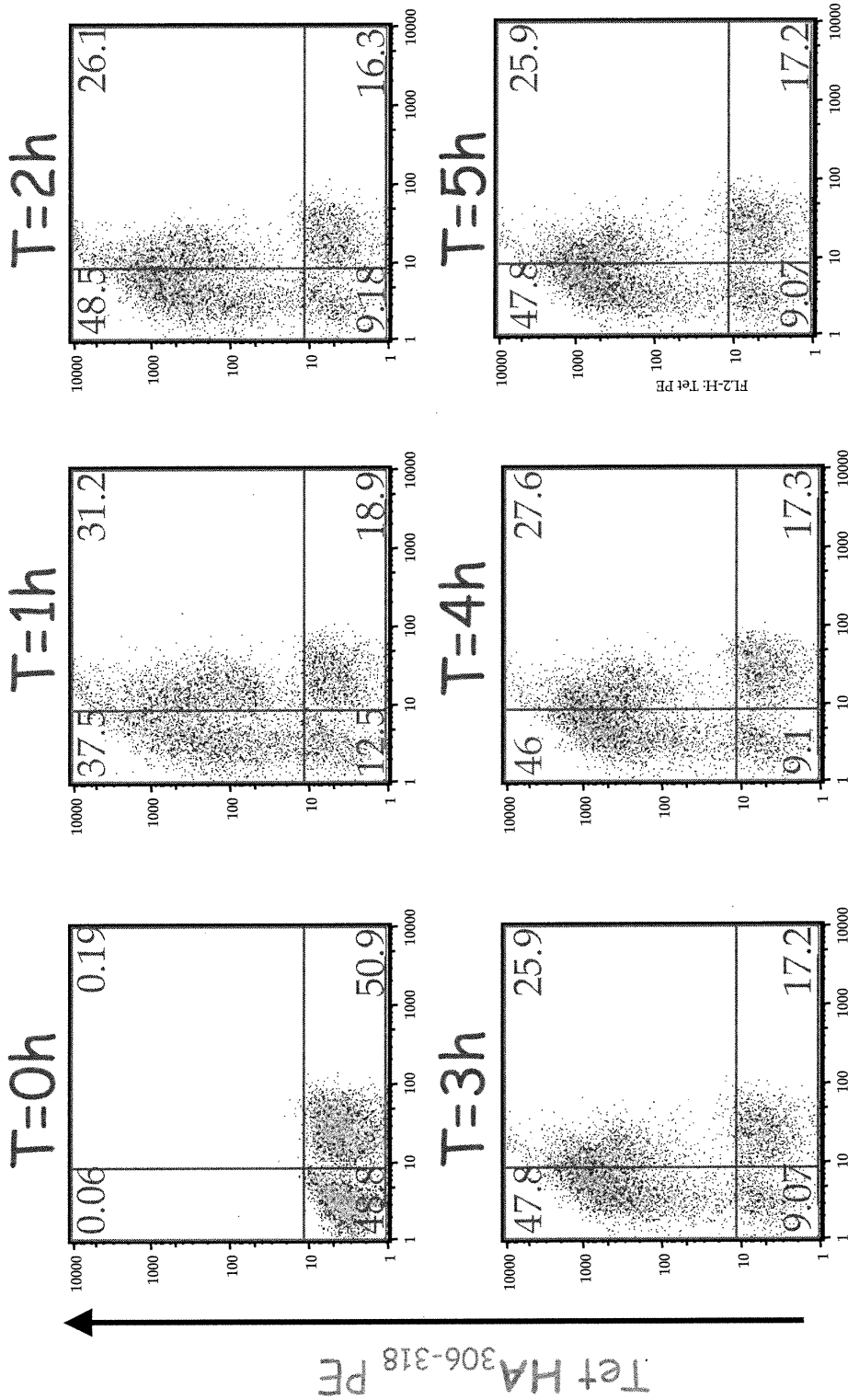
*Cinétique de coloration de la lignée cellulaire HA03 avec les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> à 37°C (Figures 22 et 23).*

L'incubation de la lignée HA03 avec les tétramères pour une durée variable (de une à cinq heures) à 37°C nous montre qu'au bout de 1 heure toutes les cellules sont colorées et que leur nombre n'augmente pas même si le temps d'incubation est plus long. À 20µg/ml de tétramères (concentration saturante) et un temps



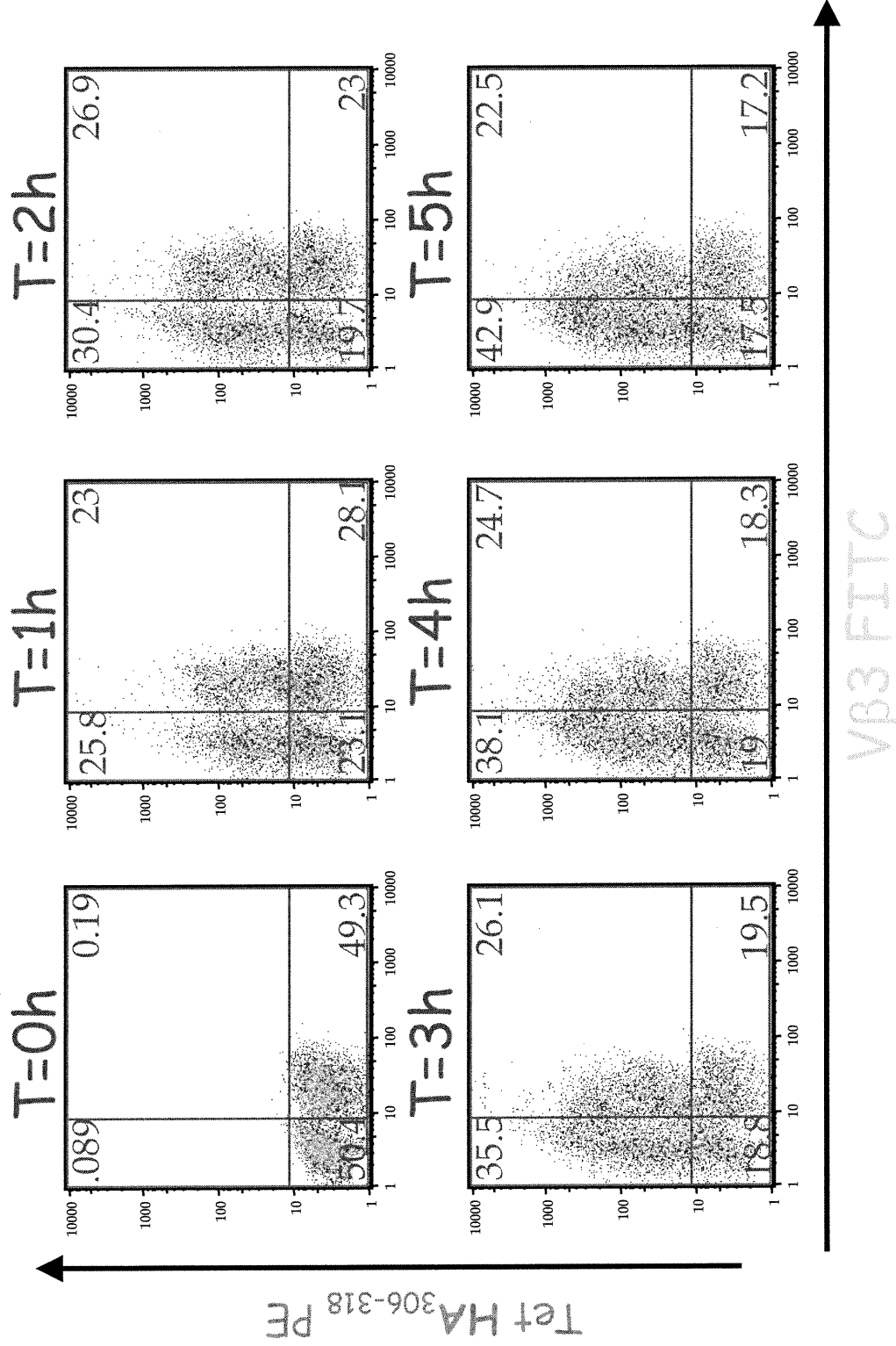
Vβ3 FITC

**FIGURE 21.** Coloration de la lignée CD4 spécifique de HA<sub>306-318</sub> avec des concentrations croissantes de tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>. La lignée HA03 est incubée avec différentes concentrations de tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> pendant trois heures à 37°C avant analyse par cytométrie en flux avec un anti-Vβ3 FITC. Tous les graphes sont faits sur les cellules vivantes CD4<sup>+</sup>.



Vβ3 FITC

**FIGURE 22.** Coloration de la lignée HA03 pendant des temps d'incubation variant de une à cinq heures. La lignée HA03 est colorée avec les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> (20µg/ml) à 37 °C et ceci à différents temps d'incubation (zéro, une, deux, trois, quatre et cinq heures). Les graphes montrent la coloration des cellules CD4<sup>+</sup> vivantes avec Vβ3 FITC et les tétramères-PE. Les tétramères n'ont pas été ajouté à l'échantillon T=0h.

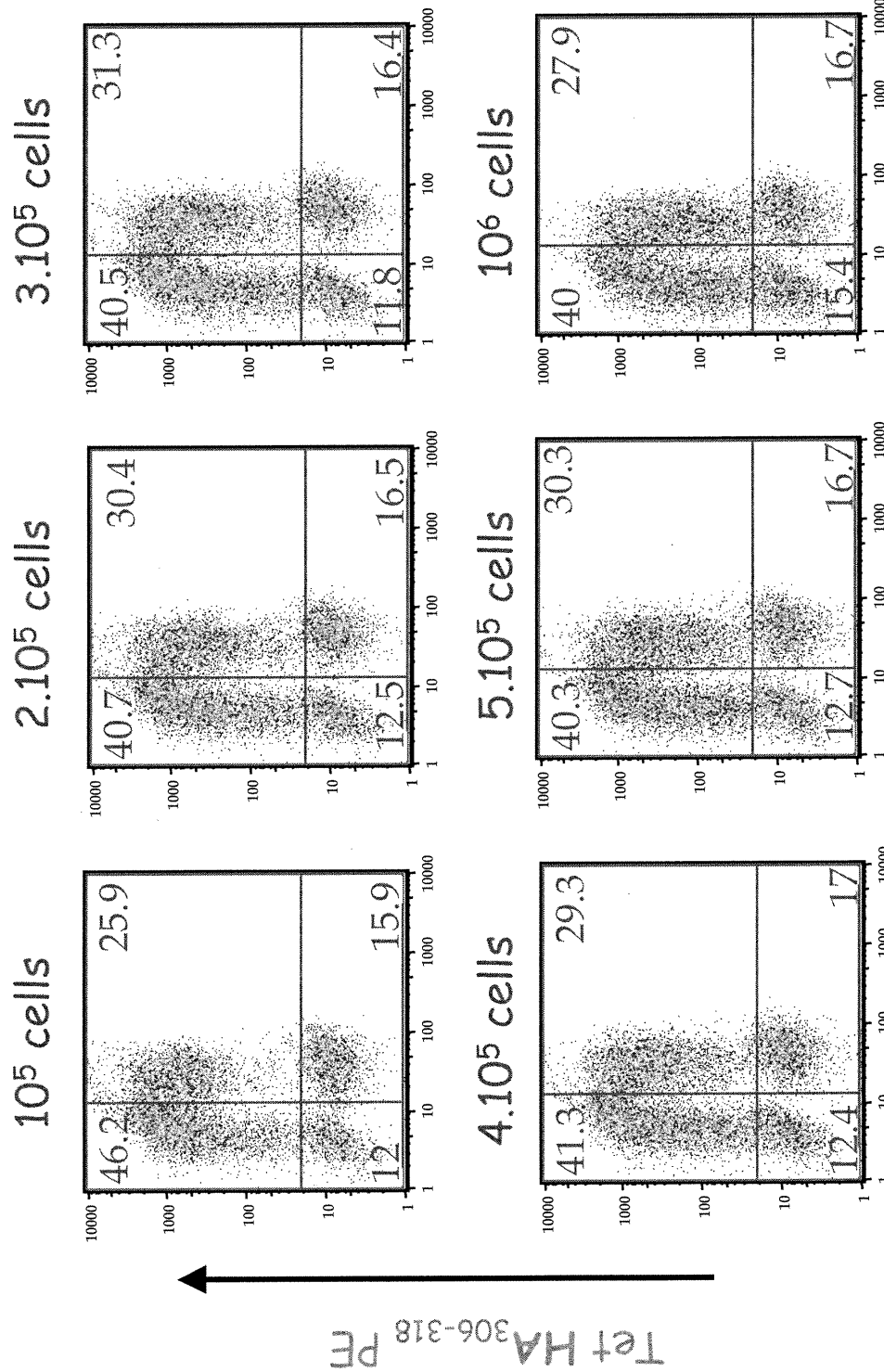


**FIGURE 23.** Coloration de la lignée HA03 pendant des temps d'incubation variant de une à cinq heures. La lignée HA03 est colorée avec les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> (2µg/ml) à 37 °C et ceci à différents temps d'incubation (zéro, une, deux, trois, quatre et cinq heures). Les graphes montrent la coloration des cellules CD4<sup>+</sup> vivantes avec Vβ3 FITC et les tétramères-PE. Le stémères n'ont pas été ajouté à l'échantillon T=0h.

d'incubation de une heure, on est capable de distinguer les différents clones qui composent la lignée HA03. Les cellules les moins affines ne sont donc pas saturées en tétramères. Par contre au bout de trois heures d'incubation, on n'a plus qu'une seule population tétramère-positif, population dont le niveau de fluorescence est élevé. À 20µg/ml de tétramères, il n'est donc pas nécessaire de colorer les cellules pour une durée supérieure à trois heures. Par contre à faible concentration en tétramères (2µg/ml), une coloration de une heure ne permet pas de capter toutes les cellules tétramères positives et donc plus le temps d'incubation est long (minimum trois heures) meilleure est la coloration. Le phénomène d'internalisation du complexe tétramère-TCR est visible dès la première heure de coloration. Il suffit, pour s'en apercevoir de comparer le temps d'incubation une heure dans l'expérience faite avec 2µg/ml de tétramères avec celle faite avec 20µg/ml de tétramères.

*Nombre maximum de cellules spécifiques du peptide HA<sub>306-318</sub> détectables par les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>. (Figure 24).*

Pour évaluer le nombre de cellules qui peuvent être marquées par une concentration en tétramères de 20µg/ml, un nombre croissant de cellules (de 10<sup>5</sup> cellules à 10<sup>6</sup> cellules) de la lignée HA03 a été incubé pendant trois heures à 37°C avec les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>. Vingt µg/ml de tétramères est une concentration largement suffisante pour colorer un million de cellules (on détecte dans tous les cas le même nombre de cellules Tet<sup>+</sup>). Cette concentration reste cependant non saturante, ce qui explique que l'on ne puisse distinguer plusieurs populations d'affinité différente.

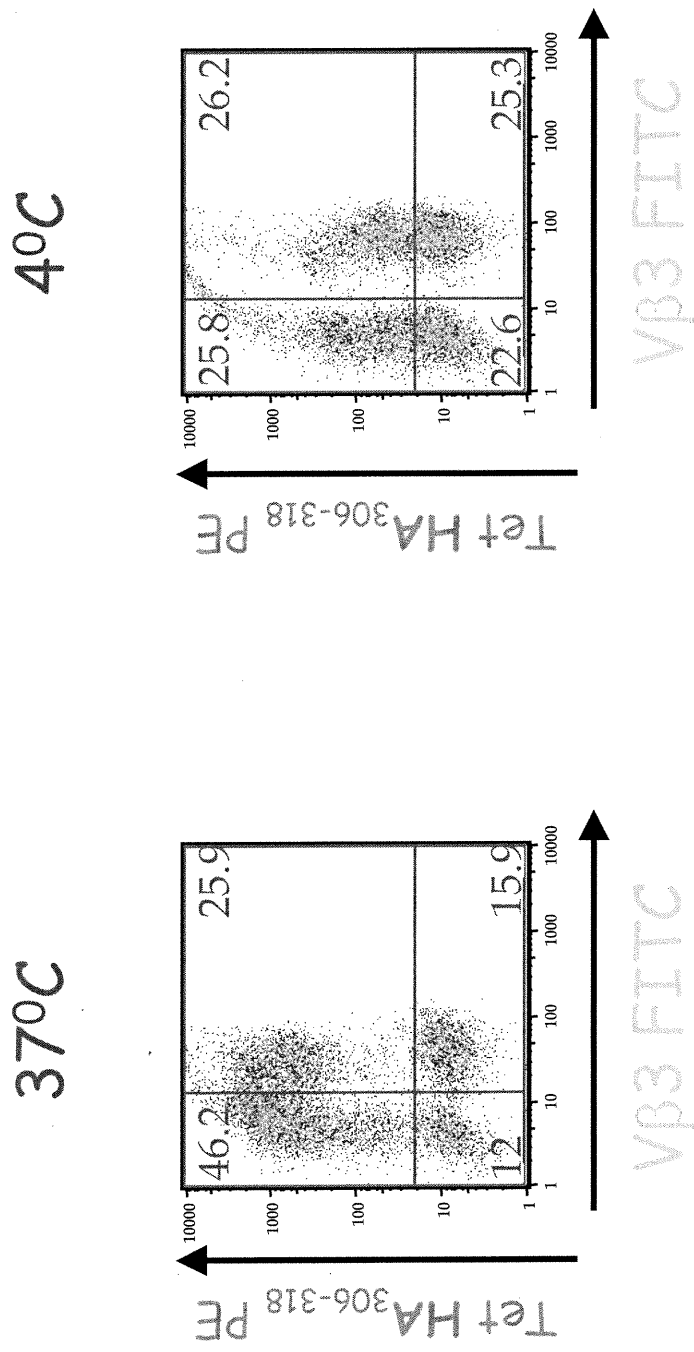


**FIGURE 24.** Coloration d'un nombre croissant de cellules HA03 avec les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>. Après une semaine de restimulation avec le peptide HA<sub>306-318</sub> (20µg/ml), la lignée cellulaire HA03 est incubée à 37°C avec les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> (20µg/ml) pour trois heures. Les analyses au FACS ont été faites sur les cellules T CD4+ vivantes.

*Coloration de la lignée cellulaire HA03 par les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> en fonction de la température (Figure 25).*

On sait que les interactions CMH/peptide-TCR sont fortement dépendantes de la température. Il était donc intéressant de voir si, en diminuant la température d'incubation des tétramères, il y avait moins de formation de complexes tétramère-TCR stables et donc une coloration par les tétramères de la lignée plus faible. La lignée a donc été marquée avec les tétramères (20µg/ml) à 37°C et 4°C. En ce qui concerne les cellules Vβ3<sup>+</sup> Tet<sup>+</sup>, on en détecte à peu près 26% quelle que soit la température d'incubation. Mais à 37°C, le marquage est beaucoup plus intense qu'à 4°C et permet donc de mieux distinguer les populations Tet<sup>+</sup> des populations Tet<sup>-</sup>. Par contre on détecte beaucoup plus de cellules Vβ3<sup>-</sup> Tet<sup>+</sup> à 37°C qu'à 4°C. Comme on l'a vu auparavant, les cellules Vβ3<sup>-</sup> Tet<sup>+</sup> semblent être de plus faible affinité (et donc avoir une constante de dissociation plus rapide) que les clones Vβ3<sup>+</sup> Tet<sup>+</sup>. À 37°C, température favorable aux interactions CMH-TCR, il y a formation de plus de complexes tétramère-TCR, donc il y a plus de cellules Vβ3<sup>-</sup> Tet<sup>+</sup> qu'à 4°C (46% au lieu de 26%). Par contre les cellules Vβ3<sup>+</sup> Tet<sup>+</sup>, de plus forte affinité, sont moins influençables par la température et sont aussi bien détectées à 4°C qu'à 37°C. L'incubation avec les tétramères à 37°C améliore donc l'intensité de la coloration des cellules antigène-spécifiques résultant principalement en une meilleure séparation des populations Tet<sup>+</sup> et Tet<sup>-</sup> et permettant de détecter les cellules de faible affinité.

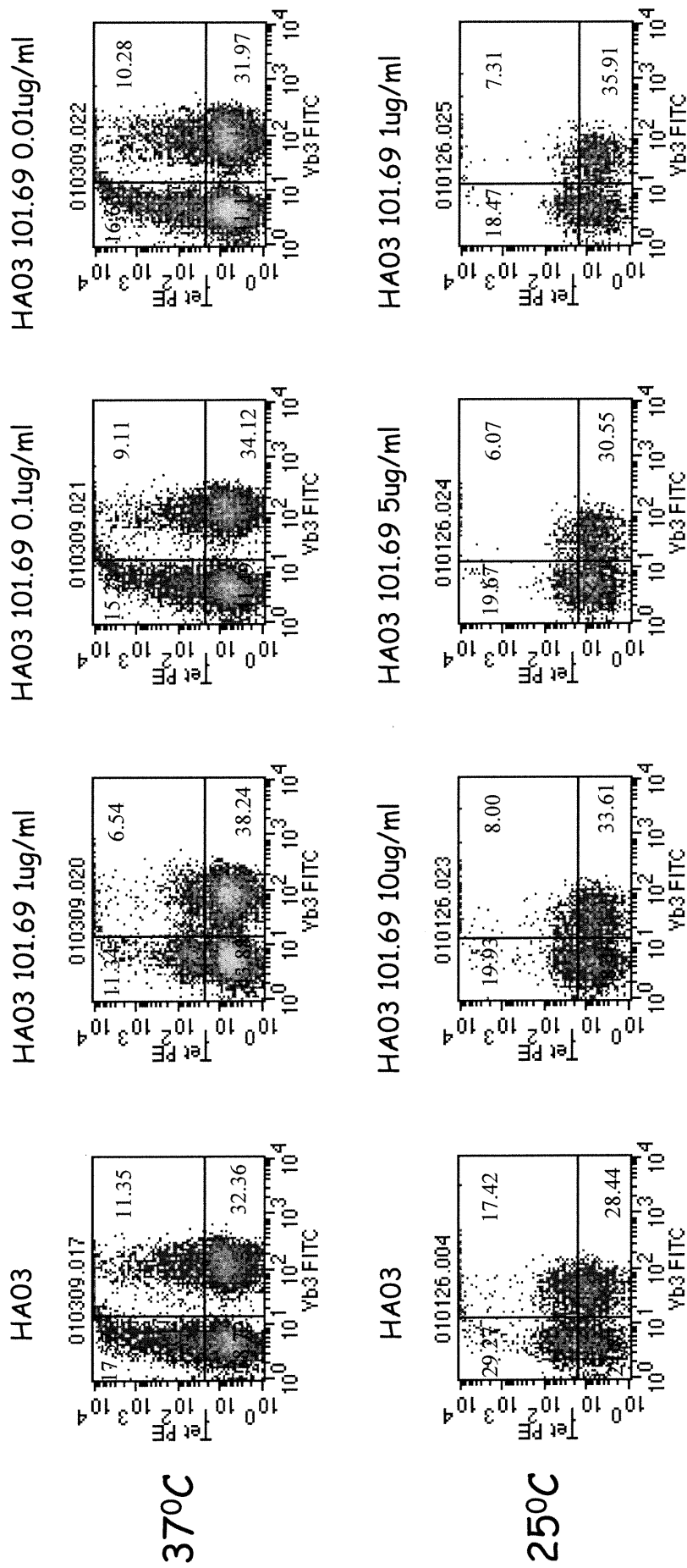




**FIGURE 25.** Effet de la température sur la coloration de la lignée HA03 avec les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>. Le marquage de la lignée HA03 est réalisé pendant trois heures avec une concentration en tétramères de 20µg/ml et ceci à deux températures différentes: 4°C et 37 °C. Les graphes nous montrent les populations CD4<sup>+</sup> vivantes qui ont également été colorées par un anticorps anti-Vβ3 FITC pendant 30 minutes à 4°C.

#### **4. IMPORTANCE DU CO-RECEPTEUR CD4 DANS L'INTERACTION DES COMPLEXES TÉTRAMÉRIQUES HLA-DR0101/PEPTIDE AVEC LE TCR (Figure 26).**

Pour déterminer la contribution du récepteur CD4 dans la liaison du tétramère au TCR, nous avons comparé les effets d'un panel d'anticorps anti-CD4, reconnaissant des épitopes différents, sur la fixation du tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>. La lignée HA03 est incubée pour 30 minutes à 4°C avec les anticorps (10µg/ml, 5µg/ml et 1µg/ml) puis trois heures à 25°C avec les tétramères (10µg/ml). Tous les anticorps ont un effet inhibiteur (plus ou moins prononcé) sur la liaison du tétramère au TCR. Afin de mieux évaluer le rôle du CD4 dans la fixation du tétramère, tous les anticorps ont été dosés sur des PBMC (Données non montrées). Nous avons alors refait une deuxième série d'expériences avec les mêmes anticorps mais à trois concentrations non saturantes comme déterminées par titration. Ces expériences ont été faites à 37°C dans le but d'augmenter la coloration par les tétramères et donc de mieux pouvoir observer notre effet inhibiteur. L'effet inhibiteur est identique quelles que soient les conditions de coloration. Le pourcentage maximal d'inhibition (40%) est obtenu pour les anticorps Leu 3a, B66 et 101.69 (Tableau 7). Nous n'avons pas observé de coloration avec un tétramère HLA-DR0101 lié avec un autre peptide que le peptide HA<sub>306-318</sub> ce qui indique que l'anticorps anti-CD4 ne change pas la spécificité de notre tétramère.



**FIGURE 26.** Inhibition de la liaison du tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> avec un panel d'anticorps anti-CD4. La lignée HA03 est incubée pendant 30 minutes avec différentes concentrations d'anticorps anti-CD4 101.69 à 25°C ou 37°C puis avec les tétramères HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> pendant trois heures.

$$\frac{\% \text{Tet}^+ \text{No Ab} - \% \text{Tet}^+ \text{Ab}}{\% \text{Tet}^+ \text{No Ab}}$$

$$\% \text{Tet}^+ \text{No Ab}$$

mAbs	Epitope	Inhibition de la liaison du tétramère
LEU3a	D1 (35-47)	40.58 %
B66	D1 (39-43)(45-47)(48-52)(99-105)	38.96%
L68	D1 (19-20)	29.77%
L112	D1 (39-52)	17.49%
101.69	D1 (39-43) (45-47) D4 (370-375)	40.18%
L117	D2 (121-123) D4 (349-356)(370-375)	2.25%
MT405	D3 (277-280)	21.61%
L120	D3 (220-226) D4 (349-356)	29.70%

**TABLEAU 7.** Identification des épitopes de la molécule de CD4 responsables de l'interaction avec les tétramères de CMH classe II.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

### 1. Production des complexes HLA-DR/peptide.

Afin d'étudier la réponse antigène-spécifique des cellules T CD4<sup>+</sup>, nous avons généré des tétramères de CMH de classe II (HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et DR0401). Ces molécules permettent une analyse directe et très précise de cette réponse par la technique de cytométrie en flux.

Une des limites pour développer un tel outil étant la faible efficacité de production, nous avons choisi de produire des molécules recombinantes liant de façon covalente le peptide antigénique. Cette stratégie permet de contourner le problème de l'instabilité des molécules de CMH de classe II vides ainsi que le fait que ces molécules soient chargées avec des peptides endogènes qui doivent être ensuite échangés avec le peptide désiré. De nombreuses études ont montré que le linker permet la liaison du peptide dans la poche peptidique, assure la stabilisation de la molécule de CMH de classe II et n'empêche pas la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR (74,129,137). Tous les peptides sélectionnés (HA, TT, pp65-1, pp65-2 et IE1) peuvent se lier aux quatre molécules HLA-DR choisies. Nous avons également opté pour un système de production eucaryote plutôt que bactérien pour éviter toutes les étapes de renaturation des protéines. Notre système de production est bien établi et est contrôlé à chaque étape par des tests de qualité et de quantification. Une quantité moyenne de 0.5mg de protéines est obtenue pour un litre de culture ce qui nous procure une quantité importante de complexes tétramériques pour faire des analyses. En respectant les conditions optimales de coloration par les tétramères que l'on a déterminées ( $2 \times 10^5$  cellules colorées avec 20µg/ml de tétramères dans un volume final de 15µl et ce à 37°C pendant trois heures) (Figures 21-25), nous pouvons ainsi effectuer 1000 tests. Le fait de produire des molécules liant de façon covalente le peptide antigénique ne représente pas un facteur limitant car notre vecteur d'expression est extrêmement flexible et permet de cloner en une seule digestion n'importe laquelle des molécules de CMH de classe II

avec n'importe lequel des peptides. La production d'un nouveau tétramère prend deux mois (en comptant le clonage, la transfection des cellules S2 et la production).

## 2. Fonctionnalité des tétramères HLA-DR/peptide.

Nos molécules de CMH de classe II ont une bonne conformation et le linker ne gêne ni la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR, ni la liaison du peptide dans la poche peptidique. En effet, le tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> migre en gel SDS-PAGE, dans des conditions non dénaturantes, sous une forme compacte (Résultats non montrés). De plus, des cellules transfectées avec une molécule HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> membranaire et liant de façon covalente le peptide sont colorées par l'anticorps L243, anticorps reconnaissant un épitope conformationnel de la molécule de CMH de classe II (Résultats non montrés). Nous avons réalisé un test fonctionnel montrant que nos molécules de CMH de classe II pouvaient stimuler une lignée cellulaire générée au laboratoire et un clone spécifique du peptide HA<sub>306-318</sub> (Figure 10). Ces cellules peuvent être stimulées *in vitro* par des cellules DAP et Hela transfectées par la construction HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub>. Les cellules DAP et Hela transfectées avec la molécule vide n'ont pas d'activité à moins qu'elles ne soient chargées avec le peptide HA<sub>306-318</sub>. De plus, le fait d'ajouter du peptide sur les cellules transfectées avec la molécule HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> n'augmente pas la prolifération des cellules T ce qui est un signe que nos molécules recombinantes sont capables d'induire une réponse maximale.

## 3. Spécificité des molécules HLA-DR/peptide.

Les tétramères ayant une forte avidité pour les cellules T, il pourrait y avoir une réaction croisée avec une cellule T non spécifique. Par conséquent, le nombre de cellules T spécifiques d'un certain épitope serait surestimé du fait de la contamination par des cellules non spécifiques.

Le tétramère HLA-DR0101/HA<sub>306-318</sub> marque la lignée cellulaire HA03 et le clone jurkat CH7C17 dont le TCR est spécifique du peptide HA<sub>306-318</sub> présenté dans le contexte HLA-DR0101 (Figure 16). Ce complexe tétramérique permet de détecter des cellules à une fréquence aussi basse que 0.25 % comme déterminé dans l'expérience de dilution de la lignée dans des PBMC (Figure 17). Pour s'assurer que la fixation du tétramère est bien restreinte par la molécule HLA-DR, nous pourrions utiliser des anticorps anti-HLA-DP ou anti-HLA-DQ et voir si la fixation du tétramère HLA-DR est bloquée ou non.

En faisant varier la concentration en tétramères, le temps de coloration ou le nombre de cellules colorées, on constate que l'on marque toujours le même pourcentage de cellules avec les tétramères. Ces résultats démontrent la spécificité de nos molécules recombinantes (Figures 21-25). Dans certaines conditions, différentes populations ayant un niveau de fluorescence plus ou moins élevé peuvent être distinguées. Jusqu'à présent, les études utilisant les tétramères n'ont été réalisées que sur des clones de forte affinité. Le fait d'utiliser des PBMC montre que les tétramères permettent de distinguer des populations de différentes affinités (Figures 21-25). La variation dans l'intensité de la coloration avec les tétramères peut être expliquée de deux manières: (a) une différence du niveau d'expression des molécules du TCR qui n'est pas détectable par un anticorps anti-TCR mais qui est détectable par un complexe tétramérique CMH/peptide ou (b) un taux de dissociation de l'interaction TCR/CMH-peptide qui est légèrement plus élevé pour les clones de faibles affinités entraînant un niveau de fluorescence plus faible. Pour tester cette dernière hypothèse, il serait judicieux de mesurer l'affinité du TCR des différentes sous-populations de la lignée cellulaire HA03 dans des tests de BIAcore. En se plaçant dans des conditions non saturantes (faible concentration en tétramères, temps d'incubation court et/ou une forte concentration cellulaire), les clones de faible affinité peuvent être distingués des clones de forte affinité. Nous avons constaté que dans le contexte de la lignée cellulaire HA03, les clones V $\beta$ 3<sup>+</sup> sont les plus colorés par les tétramères. Plusieurs études ont montré qu'il existait un lien direct entre l'affinité du TCR et la coloration avec les tétramères (74,138,139). Une étude réalisée *in vivo* a montré, grâce aux tétramères, que dans le cas d'une infection

murine avec *Listeria monocytogenes*, ce sont les cellules les plus affines qui sont sélectionnées au cours du temps (123). Nous menons actuellement une étude sur l'établissement des cellules mémoires dans le cas de la réponse contre l'influenza sur un individu pour lequel nous avons produit des lignées cellulaires durant trois ans. Cette étude permettra de déterminer si les cellules les plus affines constituent bien une population de cellules mémoires. Nous avons trié par cytométrie en flux les cellules V $\beta$ 3 de différentes affinité dont le phénotype devra être établi.

Un autre paramètre important pour la liaison du tétramère au TCR est la température à laquelle se fait la coloration. Nous avons comparé deux températures: 4°C et 37°C. Un des facteurs le plus important pour déterminer l'interaction d'un ligand pour son récepteur est la constante de dissociation ou  $K_{off}$ : pour un même TCR, les phases de dissociation du ligand de son récepteur sont plus lentes à 37°C qu'à 4°C (26). Dans le cas de la lignée HA03 :

- On colore le même nombre de cellules Tet<sup>+</sup> V $\beta$ 3<sup>+</sup> à 37°C qu'à 4°C. Par contre la coloration est plus intense à 37°C: le  $K_{off}$  de la réaction étant plus lent à 37°C, les TCR sont plus saturés et donc le niveau de fluorescence de la coloration avec les tétramères est plus fort
- On colore plus de cellules Tet<sup>+</sup> V $\beta$ 3<sup>-</sup> à 37°C qu'à 4°C. A 37°C, cette population est entièrement marquée par les tétramères mais elle a un niveau de fluorescence plus faible que la population Tet<sup>+</sup> V $\beta$ 3<sup>+</sup>: elle semble être moins affine. Ces cellules ont donc un  $K_{off}$  plus élevé que les cellules Tet<sup>+</sup> V $\beta$ 3<sup>+</sup> et ne sont pas toutes marquées par les tétramères à 4°C.

Whelan *et al.* ont montré que la température 37°C est plus stringente, en ce qui concerne la liaison du tétramère, que la température 4°C : en effet, à 4°C, un certain nombre de cellules non spécifiques peuvent être colorées (140). Cela ne semble pas être notre cas puisque nos tétramères colorent moins de cellules à 4°C qu'à 37°C. Par conséquent, nous disposons d'un outil très spécifique (Figure 25).

En jouant sur la température d'incubation, le temps d'incubation et/ou sur la concentration en tétramères utilisée, on constate également qu'il y a une diminution de la fluorescence des cellules en ce qui concerne le V $\beta$ 3 (Figures 21-25). Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène: (a) il y a un encombrement stérique



entre le tétramère et l'anticorps anti-V $\beta$ 3 pour la fixation au TCR (b) le TCR est internalisé après fixation du tétramère. Pour valider ou éliminer la deuxième possibilité, on pourrait regarder si le CD3 est lui même internalisé ou bien on pourrait marquer les cellules à 4°C pour abolir tout phénomène d'internalisation (mais comme on vient de le voir, c'est une température qui ne permet pas de bien colorer les cellules de faible affinité). Cameron *et al.* ont montré que, lors de la détection des cellules avec les tétramères, les tétramères sont internalisés (137).

Une autre façon de s'assurer de la spécificité de la liaison de nos tétramères a été de corréler la fonction des cellules T avec la coloration par les tétramères. On a constaté que toutes les cellules qui prolifèrent suite à une stimulation antigénique sont Tet<sup>+</sup>. Pour ce qui est de la production d'IFN- $\gamma$ , on a constaté que toutes les cellules colorées par les tétramères ne produisent pas d'IFN- $\gamma$ : ceci suggère que des cellules tétramères positives ne sont pas forcément des cellules effectrices. D'autres équipes ont établi la même constatation (141, 142). Par contre, toutes les cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  ne sont pas détectées par les tétramères. Ce fait ne remet cependant pas en cause la validité de notre outil : on peut penser qu'après 6 heures de stimulation antigénique à 37°C, il y a eu internalisation du TCR, notamment pour les clones les plus affins. C'est pourquoi on ne retrouve pas les clones Tet<sup>+</sup> les plus hauts en fluorescence (que l'on avait dans la condition « non stimulé ») quand on regarde la production d'IFN- $\gamma$  (Figure 18).

Afin de s'assurer de la spécificité de la coloration avec les tétramères, nous avons compétitionné la liaison du tétramère avec des anticorps anti-TCR et anti-CD4. Quand les anticorps sont incubés avant les tétramères, il y a effectivement une diminution de la coloration par les tétramères. La spécificité de nos tétramères est une fois de plus confirmée (Figure 20).

#### 4. Rôle du co-récepteur CD4 dans la liaison du tétramère au TCR.

Nous avons testé un panel d'anticorps anti-CD4 reconnaissant différents épitopes de la molécule CD4. Nos résultats montrent que les anticorps anti-CD4 bloquent la coloration avec les tétramères, et ce de façon plus ou moins forte selon l'anti-CD4 utilisé. Les anticorps qui reconnaissent un épitope dans le domaine D1 de la molécule CD4 sont les plus efficaces pour compétitionner la liaison du tétramère au TCR. Seul l'anticorps L117 n'inhibe pas la liaison du tétramère : cet anticorps reconnaît un épitope du domaine D2 de la molécule CD4. Le fait que tous les anticorps inhibent la liaison du tétramère au TCR alors qu'ils reconnaissent des épitopes différents suggère un problème d'encombrement stérique (Figure 26 et tableau 7). Pour s'assurer que l'effet observé n'est pas dû à l'internalisation du TCR, il faudrait faire l'expérience à 4°C.

Nos données ne peuvent pas statuer sur la participation du co-récepteur CD4 à la liaison du tétramère au TCR. Pour réellement évaluer le rôle du co-récepteur CD4, il faudrait colorer des cellules CD4<sup>+</sup>. D'autres études ont montré que le CD4 ne jouerait pas un rôle dans la liaison du CMH de classe II au TCR mais qu'il serait par contre nécessaire plus en aval: il faudrait qu'il y ait une interaction stable TCR/CMH pour que le co-récepteur CD4 soit recruté (14,74). Il a, par contre, été montré que le co-récepteur CD8 jouait un rôle critique dans la liaison du tétramère au TCR (143,144).

En conclusion finale, nous avons mis au point un outil très important pour l'étude de la réponse anti-virale à médiation cellulaire. Les tétramères ont de nombreuses applications, notamment pour l'étude des maladies infectieuses telles que le SIDA et l'hépatite C ainsi que des maladies autoimmunes telles que la polyarthrite et la sclérose en plaque. En outre, ils peuvent être aussi utilisés pour étudier la réponse anti-cancer de même que pour effectuer le suivi de la réponse immunitaire après vaccination.

## RÉFÉRENCES

1. **Matsui, K., Boniface, J.J., Reay, P.A., Schild, H., Fazekas de St. Groth, B., and Davis, M.M.** 1991. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptor. *Science*. 254:1788-1791.
2. **Matsui, K., Boniface, J.J., Steffner, P., Reay, P.A., and Davis, M.M.** 1994. Kinetics of T cell receptor binding to peptide-MHC complexes: correlation of the dissociation rate with T cell responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:12862-12866.
3. **Lyons, D.S., Lieberman, S.A., Hampl, J., Boniface, J.J., Chien, Y., Berg, L.J., and Davis, M.M.** 1996. A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity*. 5:53-61.
4. **Rabinowitz, J.D., Beeson, C., Wülfing, C., Tate, K., Allen, P.M., Davis, M.M., and McConnell, H.M.** 1996. Altered T cell receptor ligands trigger a subset of early T cell signals. *Immunity*. 5:125-135.
5. **Beeson, C., Rabinowitz, J.D., Tate, K., Gütgemann, I., Chien, Y.-H., Jones, P.J., Davis, M.M., and McConnell, H.M.** 1996. Early biochemical signals arise from low affinity TCR-ligand reactions at the cell-cell interface. *J. Exp. Med.* 184:777-782.
6. **Windhagen, A., Scholz, C., Höllsberg, P., Fukaura, H., Sette, A., and Hafler, D.A.** 1995. Modulation of cytokine patterns of human alloreactive T cell clones by a single amino acid substitution of their peptide ligand. *Immunity*. 2:373-380.
7. **Sloan-Lancaster, J., Shaw, A.S., and Allen, P.M.** 1993. Induction of T cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature*. 363:156-159.
8. **Jameson, S.C., and Bevan, M.J.** 1995. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity*. 2:1-11.
9. **Sloan-Lancaster, J., and Allen, P.M.** 1996. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu. Rev. Immunol.* 14:1-27.
10. **Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., and Chien, Y.** 1998. Ligand recognition by  $\alpha\beta$  T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16:523-544.

11. **Margulies, D.H., Plaksin, D., Khilko, S.N., and Jelonek, M.T.** 1996. Studying interactions involving the T-cell antigen receptor by surface plasmon resonance. *Curr. Opin. Immunol.* 8:262-270.
12. **Demotz, S., Grey, H.M., and Sette, A.** 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science.* 249:1028-1030.
13. **Harding, C.V., and Unanue, E.R.** 1990. Quantification of antigen-presenting cell MHC class II/peptide necessary for T-cell stimulation. *Nature.* 346:574-576.
14. **Boniface, J.J., Rabinowitz, J.D., Wülfing, C., Hampl, J., Reich, Z., Altman, J.D., Kantor, R.M., Beeson, C., McConnell, H.M., and Davis, M.M.** 1998. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands. *Immunity.* 9:459-466.
15. **Cochran, J.R., Cameron, T.O., and Stern, L.J.** 2000. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity.* 12:241-250.
16. **Lanzavecchia, A., Lezzi, G., and Viola, A.** 1999. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell.* 96:1-4.
17. **Valitutti, S., and Lanzavecchia, A.** 1997. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol. Today.* 18:299-304.
18. **Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A.** 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature.* 375:148-151.
19. **Viola, A., and Lanzavecchia, A.** 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science.* 273:104-106.
20. **San Jose, E., Borroto, A., Niedergang, F., Alcover, A., and Alarcón, B.** 2000. Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity.* 12:161-170.
21. **Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D.L., and Vignali, D.A.A.** 2000. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity.* 13:665-675.
22. **McKeithan, T.W.** 1995. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:5042-5046.

23. **Rabinowitz, J.D., Beeson, C., Lyons, D.S., Davis, M.M., and McConnell, H.M.** 1996. Kinetic discrimination in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1401-1405.
24. **Karlergis, A.M., Boucheron, N., Doucey, N., Palmieri, E., Goyarts, E.C., Vegh, Z., Luescher, I.F., and Nathenson, S.G.** 2001. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat. Immunol.* 2:229-234.
25. **Baker, B.M., Gagnon, S.J., Biddison, W.E., and Wiley, D.C.** 2000. Conversion of a T cell antagonist into an agonist by repairing a defect in the TCR/peptide/MHC interface: implications for TCR signaling. *Immunity.* 13:475-484.
26. **Alam, S.M., Davies, G.M., Lin, C.M., Zal, T., Nasholds, W., Jameson, S.C., Hogquist, K.A., Gascoigne, N.R.J., and Travers, P.M.** 1999. Qualitative and quantitative differences in T cell receptor binding of agonist and antagonist ligands. *Immunity.* 10:227-237.
27. **Germain, R.N.** 1997. T-cell signaling: the importance of receptor clustering. *Curr. Biol.* 7:R640-R644.
28. **Reich, Z., Boniface, J.J., Lyons, D.S., Borochoy, N., Wachtel, E.J., and Davis, M.M.** 1997. Ligand-specific oligomerization of T-cell receptor molecules. *Nature.* 387:617-620.
29. **Harder, T.** 2001. Raft membrane and immunoreceptor functions. *Adv. Immunol.* 77:45-92.
30. **Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lazavecchia, A.** 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganisation of membrane microdomains. *Science.* 283:680-682.
31. **Anderson, H.A., Hiltbold, E.M., and Roche, P.A.** 2000. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat. Immunol.* 1:156-162.
32. **Baker, B.M., and Wiley, D.C.** 2001.  $\alpha\beta$  T cell receptor ligand-specific oligomerization revisited. *Immunity.* 14:681-692.
33. **Garcia, K.R.** 1999. Structural basis of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 17:369-397.
34. **Hennecke, J., and Wiley, D.C.** 2001. T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell.* 104:1-4.

35. **Ding, Y.H., Baker, B.M., Garboczi, D.N., Biddison, W.E., and Wiley, D.C.** 1999. Four A6-TCR/peptide/HLA-A2 structures that generate very different T cell signals are nearly identical. *Immunity*. 11:45-56.
36. **Itoh, Y., and Germain, R.N.** 1997. Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 186:757-766.
37. **Valitutti, S., Müller, S., Dessing, M., and Lanzavecchia, A.** 1996. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J. Exp. Med.* 183:1917-1921.
38. **Sanchez-Madrid, F., and del Pozo, M.A.** 1999. Leucocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18:501-511.
39. **Negulescu, P.A., Krasieva, T.B., Khan, A., Kerschbaum, H.H., and Cahalan, M.D.** 1996. Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity*. 4:421-430.
40. **Weiner, O.D., Servant, G., Welch, M.D., Mitchison, T.J., Sedat, J.W., and Bourne, H.R.** 1999. Spatial control of actin polymerisation during neutrophil chemotaxis. *Nat. Cell Biol.* 1:75-81.
41. **Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J.W., and Bourne, H.R.** 2000. Polarization of chemoattractant receptor signalind during neutrophil chemotaxis. *Science*. 287:1037-1040.
42. **Sperling, A.I., Sedy, J.R., Manjunath, N., Kupfer, A., Ardman, B., and Burkhardt, J.K.** 1998. TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T-cell antigen-presenting cell contact site. *J. Immunol.* 161:6459-6462.
43. **Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R.N.** 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity*. 15:691-701.
44. **Johnson, K.G., Bromley, S.K., Dustin, M.L., and Thomas, M.L.** 2000. A supramolecular basis for CD45 tyrosine phosphatase regulation in sustained T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:10138-10143.
45. **Cyster, J.G., Shotton, D.M., and William, A.F.** 1991. The dimension of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J.* 10:893-902.

46. **Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L., and Wilson, I.A.** 1996. An  $\alpha\beta$  T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*. 274:209-219.
47. **Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A.** 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 395:82-86.
48. **Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L.** 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 285:221-227.
49. **Krummel, M.F., Sjaastad, M.D., Wülfing, C., and Davis, M.** 2000. Differential clustering of CD4 and CD3 $\zeta$  during T cell recognition. *Science*. 289:1349-1352.
50. **Bromley, S.K., Laboni, A., Davis, S.J., Whitty, A., Green, J.M., Shaw, A.S., Weiss, A., and Dustin, M.L.** 2001. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat. Immunol.* 2:1159-1166.
51. **Holdorf, A.D., Lee, K.-H., Burack, W.R., Allen, P.M., and Shaw, A.S.** 2002. Regulation of lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 3:259-264.
52. **Van der Merwe, P.A., Davis, S.J., Shaw, A.S., and Dustin, M.L.** 2000. Cytoskeletal polarisation and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Sem. Immunol.* 12:5-21.
53. **Leo, A., and Schraven, B.** 2001. Adapters in lymphocyte signalling. *Curr. Opin. Immunol.* 13:307-316.
54. **Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C.** 1988. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 6:629-662.
55. **Reth, M.** 1987. Antigen receptor tail clue. *Nature*. 38:383-384.
56. **Straus, D.B., Weiss, A.** 1992. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell*. 70:585-593.
57. **Samelson, L.E., Phillips, A.F., Luong, E.T., and Klausner, R.D.** 1990. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4358-4362.

58. **Wange, R.L. and Samelson, L.E.** 1996. Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity*. 5:197-205.
59. **Iwashima, M., Irving, B.A., van Oers, N.S., Chan, A.C., and Weiss, A.** 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*. 263:1136-1139.
60. **Hatada, M.H., Lu, X., Laird, E.R., Green, J., Morgenstern, J.P., Lou, M., Marr, C.S., Phillips, T.b., Ram, M.K., Theriault, K., et al.** 1995. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T cell receptor. *Nature*. 377:32-38.
61. **Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R., and Kurosaki, T.** 1995. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 14:2499-2508.
62. **Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., and Samelson, L.E.** 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*. 92:83-92.
63. **Raab, M., da Silva, A.J., Findell, P.R., and Rudd, C.E.** 1997. Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR. *Immunity*. 6:155-164.
64. **Lewis, R.S.** 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 19:497-521.
65. **Germain, R.N., and Stefanova, I.** 1999. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu. Rev. Immunol.* 17:467-522.
66. **Glimcher, L.H., and Singh, H.** 1999. Transcription factors in lymphocyte development- T and B cells get together. *Cell*. 96:13-23.
67. **Zamoyska, R.** 1998. CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and immune responses? *Curr. Opin. Immunol.* 10:82-87.
68. **Konig, R., Huang, L.Y., and Germain, R.N.** 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature*. 356:796-798.
69. **Konig, R., Fleury, S., and Germain, R.N.** 1993. The structural basis of CD4-MHC class II interactions: coreceptor contributions to T cell receptor antigen recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr. Top. Micro. Immunol.* 205:19-42.



70. **Wu, H., Kwong, P.D., and Hendrickson, W.A.** 1997. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature*. 387:527-530.
71. **Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., and Bolen, J.B.** 1988. The CD4 and the CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56<sup>lck</sup>. *Cell*. 55:301-308.
72. **Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., Samelson, L.E., and Bolen, J.B.** 1989. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56<sup>lck</sup>. *Nature*. 338:257-259.
73. **Hamad, A.R.A., O'Herrin, S.M., Lebowitz, M.S., Srikrishnan, A., Bieler, J., Schneck, J., and Pardoll, D.** 1998. Potent T cell activation with dimeric peptide-Major Histocompatibility Complex class II ligand: the role of CD4 coreceptor. *J. Exp. Med.* 188:1633-1640.
74. **Crawford, F., Kozono, H., White, J., Marrack, P., and Kappler, J.** 1998. Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity*. 8:675-682.
75. **Hampl, J., Chien, Y., and Davis, M.M.** 1997. CD4 augments the response of a T cell to agonist but not to antagonist ligands. *Immunity*. 7:379-385.
76. **Madrenas, J., Chau, L.A., Smith, J., Bluestone, J.A., and Germain, R.N.** 1997. The efficiency of CD4 recruitment to ligand-engaged TCR controls the agonist/partial agonist properties of peptide-MHC molecule ligands. *J. Exp. Med.* 185:219-229.
77. **Beck, S., and Trowsdale, J.** 1999. Sequence organisation of the class II region of the human MHC. *Immunol. Reviews*. 167:201-210.
78. **Madden, D.R.** 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* 13:587-622.
79. **Sadegh-Nasseri, S., and Germain, R.** 1991. A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature*. 353:167-170.
80. **Stern, L.J., and Wiley, D.C.** 1992. The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty  $\alpha\beta$  heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell*. 68:465-477.
81. **Natarajan, S.K., Stern, L.J., and Sadegh-Nasseri, S.** 1999. Sodium dodecyl sulfate stability of HLA-DR1 complexes correlates with burial of hydrophobic residues in pocket 1. *J. Immunol.* 162:3463-3470.

82. **Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., and Wiley, D.C.** 1993. Three-dimensional structure of the class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 364:33-39.
83. **Fields B.A., Ober, B., Malchiodi, E.L., Lebedeva, M.I., Braden, B.C., Ysern, X., Kim, J.K., Shao, X., Ward, E.S., Mariuzza, R.A.** 1995. Crystal structure of the V $\alpha$  domain of a T cell antigen receptor. *Science*. 270:1821-1824.
84. **Lindstedt, R., Monk, N., Lombardi, G., and Lechler, R.** 2001. Amino acid substitutions in the putative MHC class II "dimer of dimers" interface inhibit CD4<sup>+</sup> T cell activation. *J. Immunol.* 166:800-808.
85. **Nydam, T., Wade, T.K., Yadati, S., Gabriel, J.L., Barisas, B.G., and Wade, W.F.** 1998. Mutations in MHC class II dimer of dimers contact residues: effects on antigen presentation. *Int. Immunol.* 10:1237-1249.
86. **Roucard, C., Garban, F., Mooney, N.A., and Charron, D.J.** 1996. Conformation of human leucocyte antigen class II molecules. *J. Biol. Chem.* 271:13993-14000.
87. **Cherry, R.J., Wilson, K.M., Triantafilou, K., O'Toole, P., Morrison, I.E.G., Smith, P.R., and Fernandez, N.** 1998. Detection of dimers of dimers of human leucocyte antigen (HLA)-DR on the surface of living cells by single-particle fluorescence imaging. *J. Cell. Biol.* 140:71-79.
88. **Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., and Reith, W.** 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14:301-331.
89. **Long, E.O., La Vaute, T., Pinet, V., Jaraquemedas, D.** 1994. Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J. Immunol.* 153:1487-1494.
90. **Romagnoli, P., and Germain, R.N.** 1994. 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.* 180:1107-1113.
91. **Riese, R.J., Wolf, P.R., Bromme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A.** 1996. Essential role for cathepsin s in MHC class-II associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*. 4:357-366.
92. **Denzin, L.K., and Creswell, P.** 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading. *Cell*. 82:155-165.

93. **Van Ham, S.M., Tjin, E.P.M., Lillemeier, B.F., Grüneberg, U., van Meijgaarden, K.E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., et al.** 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr. Biol.* 7:950-956.
94. **Van Ham, S.M., van Lith, M., Lillemeier, B.F., Tjin, E.P.M., Grüneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K.E., Roucard, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T.H.M., Pappin, D.J.C., and Neefjes, J.** 2000. Modulation of the MHC class-II associated peptide repertoire by HLA-DO. *J. Exp. Med.* 191:1127-1135.
95. **Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L., and Wiley, D.C.** 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature.* 368:215-221.
96. **Smith, K.J., Pyrdol, J., Gauthier, L., Wiley, D.C., and Wucherpfennig, K.W.** 1998. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) complexed with a peptide from human Myelin Basic Protein. *J. Exp. Med.* 188:1511-1520.
97. **Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., and Wiley, D.C.** 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: clip bound to HLA-DR3. *Nature.* 378:457-462.
98. **Dessen, A., Lawrence, C.M., Cupo, S., Zaller, D.M., and Wiley, D.C.** 1997. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA\*0101, DRB1\*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity.* 7:473-481.
99. **Nelson, C.A., Vidavsky, I., Viner, N.J., Gross, M.L., and Unanue, E.R.** 1997. Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:628-633.
100. **Latek R.R., and Unanue, E.R.** 1999. Mechanisms and consequences of peptide selection by the I-A<sup>k</sup> class II molecules. *Immunological Reviews.* 172:209-228.
101. **Rötzschke, O., Falk, K., Mack, J., Lau, J.M., Jung, G., and Strominger, J.L.** 1999. Conformational variants of class II MHC/peptide complexes induced by N- and C-terminal extensions of minimal peptide epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:7445-7450.
102. **Godkin, A.J., Smith, K.J., Willis, A., Tejada-Simon, M.V., Zhang, J., Elliott, T., and Hill, A.V.S.** 2001. Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions. *J. Immunol.* 166:6720-6727.

103. **Kersh, G.J., Miley, M.J., Nelson, C.A., Grakoui, A., Horvath, S., Donermeyer, D.L., Kappler, J., Allen, P.M., and Fremont, D.H.** 2001. Structural and functional consequences of altering a peptide MHC anchor residue. *J. Immunol.* 166:3345-3354.
104. **Peterson, D.A., DiPaolo, R.J., Kanagawa, O., and Unanue, E.R.** 2001. A single MHC anchor residue alters the conformation of a peptide-MHC complex inducing T cells that survive negative selection. *J. Immunol.* 166:5874-5877.
105. **Basu, D., Horvth, S., O'Mara, L., Donermeyer, D., and Allen, P.** 2001. Two MHC surface amino acid differences distinguish peptide recognition from autoantigen specificity. *J. Immunol.* 166:4005-4011.
106. **Yassine-Diab, B., Carmichael, P., L'Faqihi, F.E., Lombardi, G., Deacock, S., de Preval, C., Coppin, H., and Lechler, R.I.** 1999. Biased T-cell receptor usage is associated with allelic variation in the MHC class II peptide binding groove. *Immunogenetics.* 49:532-540.
107. **Hammer, J., Valsasnini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B., and Sinigaglia, F.** 1993. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell.* 74:197-203.
108. **Detmoz, S., Barbey, C., Corradin, G., Amaroso, A., and Lanzavecchia, A.** 1993. The set of naturally processed peptides displayed by DR molecules is tuned by polymorphism of residue 86. *Eur. J. Immunol.* 23:425-432.
109. **Rammensee, H.G., Friede, T., and Stevanovic, S.** 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics.* 41:178-228.
110. **Hammer, J., Takacs, B., and Sinigaglia, F.** 1992. Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J. Exp. Med.* 176:1007-1013.
111. **Posch, P.E., Hastings, A.E., Rosen-Bronson, S., Richert, J.R., and Hurley, C.K.** 1996. The relative importance of individual DR binding motif positions as defined by peptide anchor analysis of influenza hemagglutinin peptide 306-318 and human myelin basic protein peptide 152-165 to several DR molecules: definition of a common extended DR binding motif. *Eur. J. Immunol.* 26:1884-1891.
112. **Hammer, J., Gallazi, F., Bono, E., Karr, R.W., Guenot, J., Valsasnini, P., Nagy, Z.A., and Sinigaglia, F.** 1995. Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J. Exp. Med.* 181:1847-1855.

113. **Sette, A., Sidney, J., Oseroff, C., del Guercio, M.-F., Southwood, S., Arrhenius, T., Powell, M.F., Clon, S.M., Gaeta, F.C.A., and Grey, H.M.** 1993. HLA DR4w4-binding motifs illustrate the biochemical basis of degeneracy and specificity in peptide-DR interactions. *J. Immunol.* 151:3163-3170.
114. **Hammer, J., Belunis, C., Bolin, D., Papadopoulos, J., Walsky, R., Higelin, J., Danho, W., Sinigaglia, F., and Nagy, Z.A.** 1994. High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4456-4460.
115. **Sato, K., Zarutskie, J.A., Rushe, M.M., Lomakin, A., Natarajan, S.K., Sadegh-Nasseri, S., Benedek, G.B., and Stern, L.J.** 2000. Determinants of the peptide-induced conformational change in the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR1. *J. Biol. Chem.* 275:2165-2173.
116. **Zarutskie, J.A., Sato, K., Rushe, M.M., Chan, I.C., Lomakin, A., Benedek, G.B., and Stern, L.J.** 1999. A conformational change in the human major histocompatibility complex protein HLA-DR1 induced by peptide binding. *Biochemistry.* 38:5878-5887.
117. **Kelso, A., MacDonald, H.R., Smith, K.A., Cerottini, J.C., and Brunner, K.T.** 1984. Interleukin 2 enhancement of lymphokine secretion by T lymphocytes: analysis of established clones and primary limiting dilution microcultures. *J. Immunol.* 132:2932-2938
118. **Altman, J.D., Moss, P.A.H., Goulder, P.J.R., Barouch, D.H., McHeyser-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Davis, M.M.** 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science.* 274:94-96.
119. **Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Barouch, D.H., Craiu, A., Allen, T.M., Sette, A., Watkins, D.I., Forman, M.A., and Letvin, N.L.** 1998. Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in Simian Immunodeficiency Virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex. *J. Exp. Med.* 187:1373-1381.
120. **Ogg, G.S., Bonhoeffer, S., Dunbar, P.R., Nowak, M.A., Monard, S., Segal, J.P., Cao, Y., Rowland-Jones, S.L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D.D., Nixon, D.F., and McMichael, A.J.** 1998. Quantification of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science.* 279:2103-2106.
121. **Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J.D., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J., and Ahmed, R.** 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity.* 8:177-187.

122. **Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A.C., Plückthun, A., Elliott, T., Hentgartner, H., and Zinkernagel, R.** 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic Choriomeningitis Virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 187:1383-1393.
123. **Busch, D.H., Pilip, I.M., Vijh, S., and Pamer, E.G.** 1998. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity.* 8:353-362.
124. **Novak, E.J., Liu, A.W., Nepom, G.T., and Kwok, W.W.** 1999. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4<sup>+</sup> T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J. Clin. Invest.* 104:R63-R67.
125. **Kotzin, B.L., Falta, M.T., Crawford, F., Rosloniec, E.F., Bill, J., Marrack, P., and Kappler, J.** 2000. Use of soluble peptide-DR4 tetramers to detect synovial T cell specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:291-296.
126. **Maile, R., Wang, B., Schooler, W., Meyer, A., Collins, E.J., and Frelinger, J.A.** 2001. Antigen-specific modulation of an immune response by in vivo administration of soluble MHC class I tetramers. *J. Immunol.* 167:3708-3714.
127. **Novak, E.J., Liu, A.W., Gebe, J.A., Falk, B.A., Nepom, G.T., Koelle, D.M., and Kwok, W.W.** 2001. Tetramer-guided epitope mapping: rapid identification and characterization of immunodominant CD4<sup>+</sup> T cell epitopes from complex antigens. *J. Immunol.* 166:6665-6670.
128. **Schatz, P., J.** 1993. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Bio/Technology.* 11:1138-1143.
129. **Fremont, D.H., Hendrickson, W.A., Marrack, P., and Kappler, J.** 1996. Structures of an MHC class II molecules with covalently bound single peptides. *Science.* 272:1001-1004.
130. **Rammensee, H.G., Friede, T., and Stevanovic, S.** 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics.* 41:178-228.
131. **Nepom, G.T., and Erlich, H.** 1991. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:493-525.
132. **Radka, S.F., Machamer, C.E., and Cresswell, P.** 1984. Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II  $\beta$  chains by two-dimensional electrophoresis and western blotting. *Hum. Immunol.* 10:177-186.

133. **Cohen, B.B., Deane, D.L., Van Heyningen, V., Guy, K., Hutchins, D., Moxley, M., and Steel, C.M.** 1983. Biochemical variation of human Ia like antigens detected with monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 53:41-50.
134. **Wedderburn, L.R., Searle, S.J.M., Rees, A.R., Lamb, J.R., and Owen, M.J.** 1995. Mapping T cell recognition: the identification of a T cell receptor residue critical to the specific interaction with an influenza hemagglutinin peptide. *Eur. J. Immunol.* 25:1654-1662.
135. **Fleury, S., Lamarre, D., Meloche, S., Ryu, S.-E., Cantin, C., Hendrickson, W.A., and Sekaly R.-P.** 1991. Mutational Analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell.* 66:1037-1049.
136. **Rio, D.C., Laski, F.A., and Rubin, G.R.** 1986. Identification and immunological analysis of biologically active *Drosophila* P element transposase. *Cell.* 44:21-32.
137. **Cameron, T.O., Cochran, J.R., Yassine-Diab, B., Sékaly, R.-P., and Stern, L.J.** 2001. Cutting Edge: Detection of antigen specific CD4<sup>+</sup> T cells by HLA-DR1 oligomers is dependent on the T cell activation state. *J. Immunol.* 166:741-745.
138. **Reichstetter, S., Ettinger, R.A., Liu, A.W., Gebe, J.A., Nepom, G.T., and Kwok, W.W.** 2000. Distinct T cell interactions with HLA class II tetramers characterize a spectrum of TCR affinities in the human antigen-specific T cell response. *J. Immunol.* 165:6994-6998.
139. **Burrows, S.R., Kienzle, N., Winterhalter, A., Bharadwaj, M., Altman, J.D., and Brooks, A.** 2000. Peptide-MHC class I tetrameric complexes display exquisite ligand specificity. *J. Immunol.* 165:6229-6234.
140. **Whelan, J.A., Dunbar, P.R., Price, D.A., Purbhoo, M.A., Lechner, F., Ogg, G.S., Griffiths, G., Phillips, R.E., Cerundolo, V., and Sewell, A.K.** 1999. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J. Immunol.* 163:4342-4348.
141. **Lim, D.-G., Bourcier, K.B., Freeman, G.J., and Hafler, D.A.** 2000. Examination of CD8<sup>+</sup> T cell function in humans using MHC class I tetramers: similar cytotoxicity but variable proliferation and cytokine production among different clonal CD8<sup>+</sup> T cells specific to a single viral epitope. *J. Immunol.* 165: 6214-6220.

142. **Rubio-Godoy, V., Dutoit, V., Rimoldi, D., Lienard, D., Lejeune, F., Speiser, D., Guillaume, P., Cerottini, J.-C., Romero, P., and Valmori, D.** 2001. Discrepancy between ELISPOT IFN- $\gamma$  secretion and binding of A2/peptide multimers to TCR reveals interclonal dissociation of CTL effector function from TCR-peptide/MHC complexes half-life.
143. **Denkberg, G., Cohen, C.J., and Reiter, Y.** 2001. Critical role for CD8 in binding of tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR. *J. Immunol.* 167:270-276.
144. **Daniels, M.A., and Jameson, S.C.** 2000. Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/Major Histocompatibility Complex multimers. *J. Exp. Med.* 2:335-345.



Alignement des séquences nucléotidiques des molécules HLA-  
DRB1\*0101, -DRB1\*1501, -DRB1\*0301 et -DRB1\*0401.

```

DR03011      1 -----
DR04011      1 ATGGTGTGTCTGAAGTTCCTGGAGGCTCCTGCATGCAGCCTCTGACAGTGACACTGATG
DR15011      1 ATGGTGTGTCTGAAGCTCCCTGGAGGCTCCTGCATGCAGCCCTGACAGTGACACTGATG
DR0101       1 ATGGTGTGTCTGAAGCTCCCTGGAGGCTCCTGCATGCAGCCCTGACAGTGACACTGATG
consensus    1 .....

DR03011      1 -----GGGGACACCAAGACCAGTTTCTTGGAGTACTCT
DR04011     61 GTGCTGAGCTCCCCACTGGCTTTGGCTGGGGACACCCGACCAGTTTCTTGGAGCAGGTT
DR15011     61 GTGCTGAGCTCCCCACTGGCTTTGCTGGGGACACCCGACCAGTTTCTGTGGCAGCCT
DR0101     61 GTGCTGAGCTCCCCACTGGCTTTGGCTGGGGACACCCGACCAGTTTCTGTGGCAGCTT
consensus    61 .....*****.*****.*****.

DR03011     34 ACCTCTGAGTGTCAATTTCTTCAATGGGACGGAGCGGGTGCGGTACCTGGACAGATACTTC
DR04011    121 AAACATGAGTGTCAATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCCTGGACAGATACTTC
DR15011    121 AACACGGAGTGTCAATTTCTTCAATGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCCTGGACAGATACTTC
DR0101    121 AAGTTTGAATGTCAATTTCTTCAATGGGACGGAGCGGGTGCGGTTCCTGGAAAGATCATC
consensus   121 *.....*.*****.*****.*****.*****.

DR03011     94 CATAACCAGGAGGAGAACCTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTGACC
DR04011    181 TATCACCAAGAGGAGTACGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTGACC
DR15011    181 TATAACCAGGAGGAGTCCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTGACC
DR0101    181 TATAACCAAGAGGAGTCCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGGGAGTACCGGGCGGTGACC
consensus   181 **.****.*****.*****.*****.*****.

DR03011    154 GAGCTGGGGCGGCCTGATGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGAA
DR04011    241 GAGCTGGGGCGGCCTGATGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGAA
DR15011    241 GAGCTGGGGCGGCCTGATGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACATCCTGGAGCAGCC
DR0101    241 GAGCTGGGGCGGCCTGATGCCGAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACCTCCTGGAGCAGAG
consensus   241 *****.*****.*****.*****.*****.

DR03011    214 CGGGCGCGGGTGGACAATACTACTGCAGACACAATACTACGGGGTTGTGGAGAGCTTCACAGTG
DR04011    301 CGGGCCGCGGTGGACACCTACTGCAGACACAATACTACGGGGTTGGTGAGAGCTTCACAGTG
DR15011    301 CGGGCCGCGGTGGACACCTACTGCAGACACAATACTACGGGGTTGTGGAGAGCTTCACAGTG
DR0101    301 CGGGCCGCGGTGGACACCTACTGCAGACACAATACTACGGGGTTGGTGAGAGCTTCACAGTG
consensus   301 ****.*.*****.*****.*****.*****.

DR03011    274 CAGCGGCGAGTCCATCCTAAGGTGACTGTGTATCCTTCAAAGACCCAGCCCCTGCAGCAC
DR04011    361 CAGCGGCGAGTCCATCCTAAGGTGACTGTGTATCCTTCAAAGACCCAGCCCCTGCAGCAC
DR15011    361 CAGCGGCGAGTCCAACTAAGGTGACTGTATCCTTCAAAGACCCAGCCCCTGCAGCAC
DR0101    361 CAGCGGCGAGTCCAACTAAGGTGACTGTGTATCCTTCAAAGACCCAGCCCCTGCAGCAC
consensus   361 *****.*****.*****.*****.*****.

DR03011    334 CATAACCTCCTGGTCTGCTCTGTGAGTGGTTTCTATCCAGGCAGCATTGAAGTCAGTGG
DR04011    421 CACAACCTCCTGGTCTGCTCTGTGAGTGGTTTCTATCCAGGCAGCATTGAAGTCAGTGG
DR15011    421 CACAACCTCCTGGTCTGCTCTGTGAGTGGTTTCTATCCAGGCAGCATTGAAGTCAGTGG
DR0101    421 CACAACCTCCTGGTCTGCTCTGTGAGTGGTTTCTATCCAGGCAGCATTGAAGTCAGTGG
consensus   421 **.*****.*****.*****.*****.*****.

```

Alignement des séquences nucléotidiques des molécules HLA-  
DRB1\*0101, -DRB1\*1501, -DRB1\*0301 et -DRB1\*0401.

```
DR03011 394 TTCCGGAATGGCCAGGAAGAGAAGACTGGGGTGGTGTCCACAGGCCTGATCCA CAATGGA
DR04011 481 TTCCGGAACGGCCAGGAAGAGAAGACTGGGGTGGTGTCCACAGGCCTGATCCAGAATGGA
DR15011 481 TTCCGGAACGGCCAGGAAGAGAAGGCTGGGATGGTGTCCACAGGCCTGATCCAGAATGGA
DR0101 481 TTCCGGAACGGCCAGGAAGAGAAGGCTGGGGTGGTGTCCACAGGCCTGATCCAGAATGGA
consensus 481 ****.***.*****.*****.*****.*****.*****.*****
```

```
DR03011 454 GACTGGACCTTCCAGACCCCTGGTGTGCTGGAAACAGTTCCTCGGAGTGGAGAGGTTTAC
DR04011 541 GACTGGACCTTCCAGACCCCTGGTGTGCTGGAAACAGTTCCTCGGAGTGGAGAGGTTTAC
DR15011 541 GACTGGACCTTCCAGACCCCTGGTGTGCTGGAAACAGTTCCTCGGAGTGGAGAGGTTTAC
DR0101 541 GACTGGACCTTCCAGACCCCTGGTGTGCTGGAAACAGTTCCTCGGAGTGGAGAGGTTTAC
consensus 541 *.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
```

```
DR03011 514 ACCTGCCAAGTGGAGCACCCAAGCGTGACAGCCCTCTCACAGTGAATGGAGAGCACGG
DR04011 601 ACCTGCCAAGTGGAGCACCCAAGCGTGACAGCCCTCTCACAGTGAATGGAGAGCACGG
DR15011 601 ACCTGCCAAGTGGAGCACCCAAGCGTGACAGCCCTCTCACAGTGAATGGAGAGCACGG
DR0101 601 ACCTGCCAAGTGGAGCACCCAAGCGTGACAGCCCTCTCACAGTGAATGGAGAGCACGG
consensus 601 *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
```

```
DR03011 574 TCTGAATCTGCACAGAGCAAGATGCTGAGTGGAGTCGGGGCTTTGTGCTGGGCCTGCTC
DR04011 661 TCTGAATCTGCACAGAGCAAGATGCTGAGTGGAGTCGGGGCTTTGTGCTGGGCCTGCTC
DR15011 661 TCTGAATCTGCACAGAGCAAGATGCTGAGTGGAGTCGGGGCTTTGTGCTGGGCCTGCTC
DR0101 661 TCTGAATCTGCACAGAGCAAGATGCTGAGTGGAGTCGGGGCTTTGTGCTGGGCCTGCTC
consensus 661 *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
```

```
DR03011 634 TTCCTTGGGGCCGGGCTGTTTCATCTACTTCAGGAATCAGAAAGGACACTCTGGACTTCAG
DR04011 721 TTCCTTGGGGCCGGGCTGTTTCATCTACTTCAGGAATCAGAAAGGACACTCTGGACTTCAG
DR15011 721 TTCCTTGGGGCCGGGCTGTTTCATCTACTTCAGGAATCAGAAAGGACACTCTGGACTTCAG
DR0101 721 TTCCTTGGGGCCGGGCTGTTTCATCTACTTCAGGAATCAGAAAGGACACTCTGGACTTCAG
consensus 721 *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
```

```
DR03011 694 CCAACAGGATTCCTGAGCTGA
DR04011 781 CCAACAGGATTCCTGAGCTGA
DR15011 781 CCAACAGGATTCCTGAGCTGA
DR0101 781 CCAACAGGATTCCTGAGCTGA
consensus 781 ****.*****
```





ANNEXE 4

Séquence nucléotidique et protéique de la chaîne HLA-DRA\*0101

DRA\*0101

Exon 1		30		60	
Nuc. Pos.	1	ATG GCC ATA AGT GGA GTC CCT GTG CTA GGA TTT TTC ATC ATA GCT GTG CTG ATG AGC GCT CAG GAA TCA			
DRA*0101	-23		-10		-1
Prot. Pos.	M	A I S G V P V L G F F I I A V L M S A Q E S			
Exon 1   Exon 2		120		150	
Nuc. Pos.	1	TGG GCT ATC AAA G   AA GAA CAT GTG ATC ATC CAG GCC GAG TTC TAT CTG AAT CCT GAC CAA TCA GGC GAG TTT ATG TTT GAT GGT GAT GAG ATT TTC			
DRA*0101	1		20		30
Prot. Pos.	W	A I K E E H V I I Q A E F Y L N P D Q S G E F M F D F D G D E I F			
Exon 2   Exon 3		210		240	
Nuc. Pos.	180	CAT GTG GAT ATG GCA AAG AAG GAG ACG GTC TGG CGG CTT GAA GAA TTT GGA CGA TTT GCC AGC TTT GAG GCT CAA GGT GCA TTT GCC AAC ATA GCT GTG GAC			270
DRA*0101			40		60
Prot. Pos.	H	V D M A K K E T V W R L E E F G R F A S F E A Q G A L A N I A V D			
Exon 3   Exon 4		300		360	
Nuc. Pos.	70	AAA GCC AAC CTG GAA ATC ATG ACA AAG CGC TCC AAC TAT ACT CCG ATC ACC AAT G   TA CCT CCA GAG GTA ACT GTG CTC ACG AAC AGC CCT GTG GAA CTG AGA			
DRA*0101	70		80		100
Prot. Pos.	K	A N L E I M T K R S N Y T P I T N V P P E V T V L T N S P V E L R			
Exon 4   Exon 5		420		450	
Nuc. Pos.	390	GAG CCC AAC GTC CTC ATC TGT TTC ATC GAC AAG TTC ACC CCA CCA GTG GTC AAT GTC ACG TGG CTT CGA AAT GGA AAA CCT GTC ACC ACA GGA GTG TCA GAG			
DRA*0101			110		120
Prot. Pos.	E	P N V L I C F I D K F T P P V V N V T W L R N G K P V T T G V S E			
Exon 5   Exon 6		510		540	
Nuc. Pos.	480	ACA GTC TTC CTG CCC AGG GAA GAC CAC CTT TTC CGC AAG TTC CAC TAT CTC CCC TTC CTG CCC TCA ACT GAG GAC GTT TAC GAC TGC AGG GTG GAG CAC TGG			570
DRA*0101			140		170
Prot. Pos.	T	V F L P R E D H L F R K F H Y L P F L P S T E D V Y D C R V E H W			
Exon 6   Exon 7		600		630	
Nuc. Pos.	580	GGC TTG GAT GAG CCT CTT CTC AAG CAC TGG G   AG TTT GAT GCT CCA AGC CCT CTC CCA GAG ACT ACA GAG AAC GTC GTG TGT GCC CTG GGC CTG ACT GTG GGT			
DRA*0101			180		200
Prot. Pos.	G	L D E P L L K H W E F D A P S P L P E T T E N V V C A L G L T V G			
Exon 7   Exon 8		690		720	
Nuc. Pos.	660	CTG GTG GGC ATC ATT ATT GGG ACC ATC TTC ATC ATC AAG GGA GTG CGC AAA AGC AAT GCA GCA GAA CGC AGG GGG CCT CTG TAA			
DRA*0101			210		230
Prot. Pos.	L	V G I I I G T I F I I K G V R K S N A A E R R G P L *			

LEADER

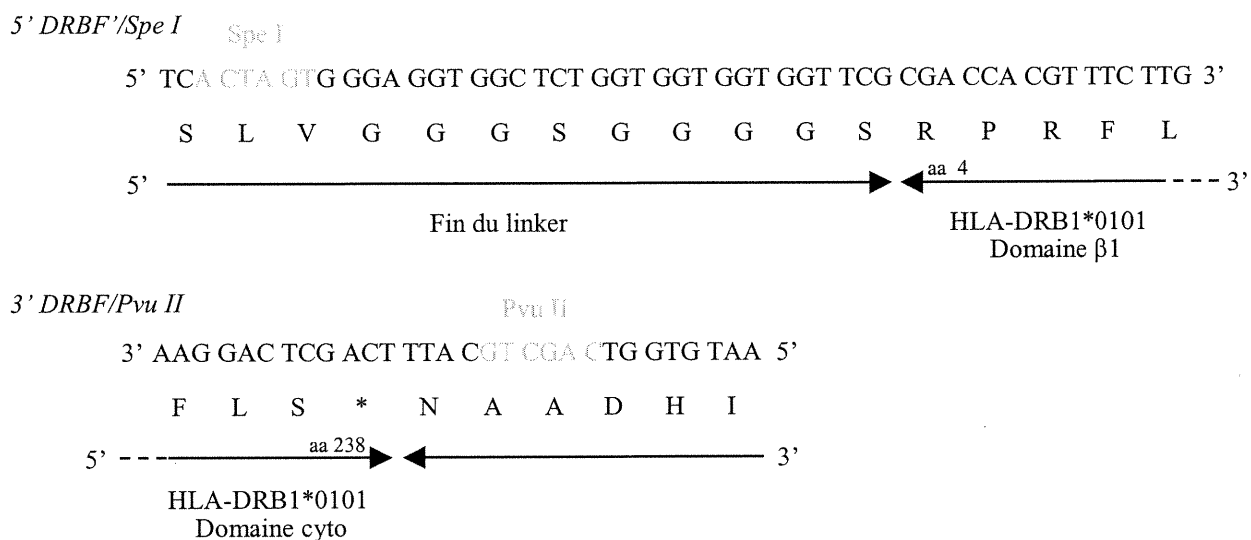
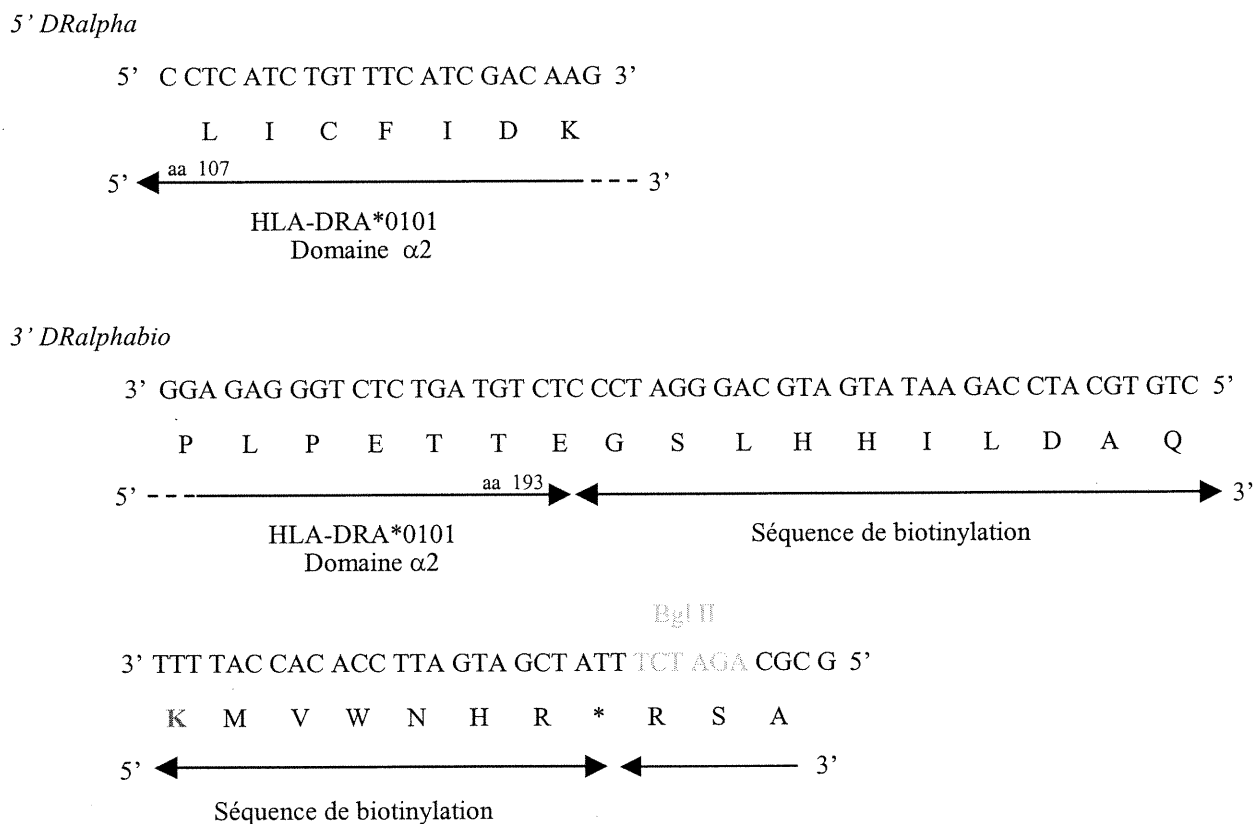
α1

α2

TM

Cyto

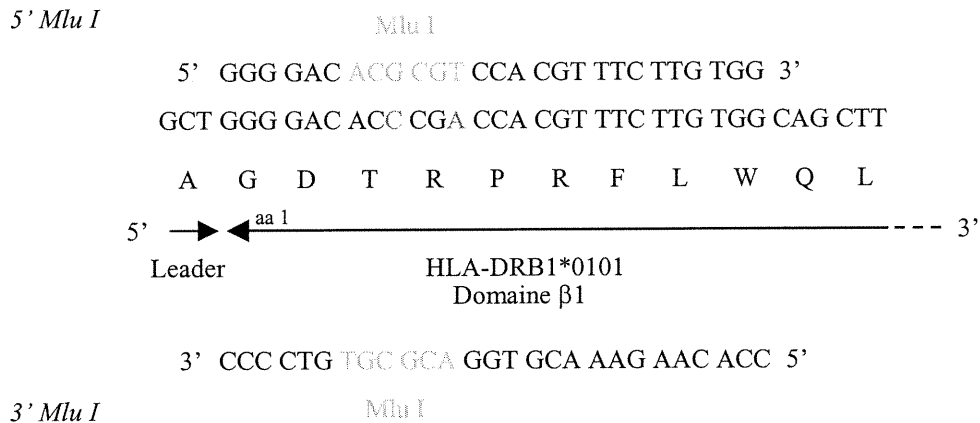
## ANNEXE 5

Clonage de l'ADNc des chaînes HLA-DR $\alpha$  et -DR $\beta$ .**Amplification de la chaîne HLA-DR $\beta$** **Amplification de la chaîne HLA-DR $\alpha$** 

## ANNEXE 6

Clonage du peptide HA<sub>306-318</sub> lié de façon covalente  
à la chaîne HLA-DRB1\*0101.

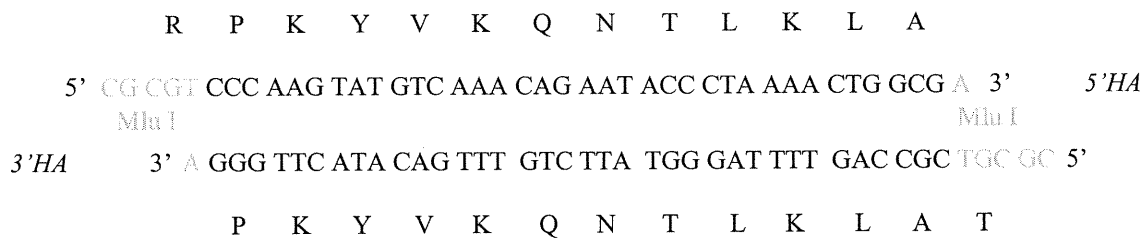
## Insertion d'un site Mlu I



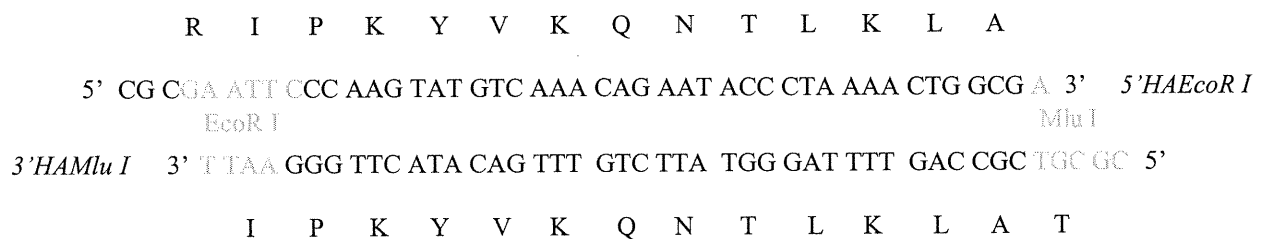
## Clonage du linker



## Clonage du peptide HA



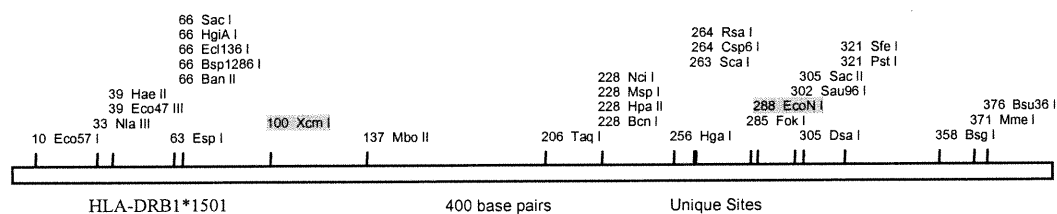
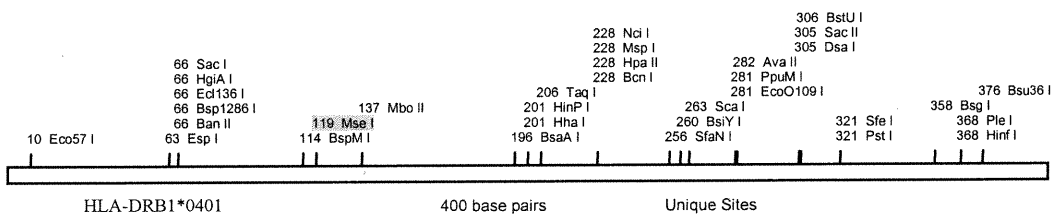
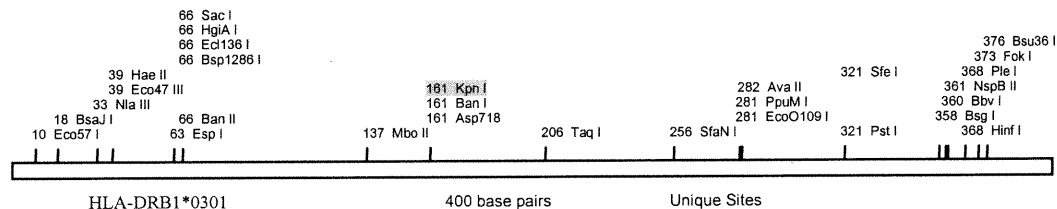
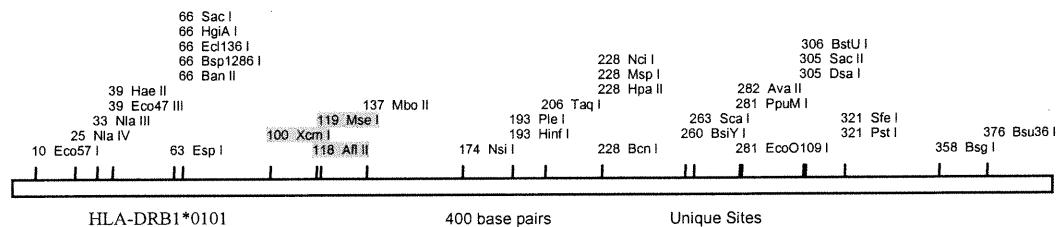
## Élimination du site Mlu I



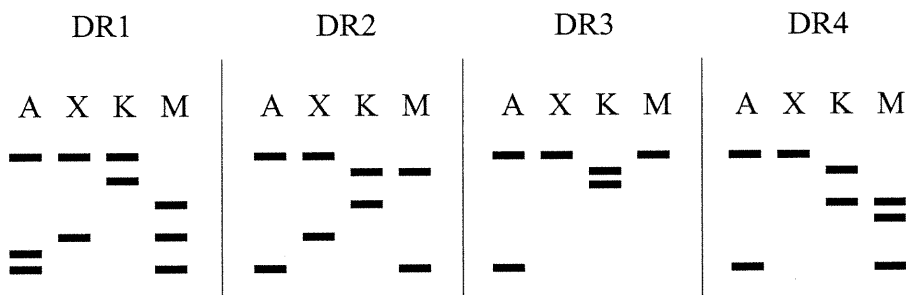
# ANNEXE 7

## Régions hypervariables des molécules HLA-DRB1\*0101, -DRB1\*1501, -DRB1\*0301 et - DRB1\*0401.

**Régions hypervariables amplifiées par les amorces 5' EcoDRb et 3' BamDRb**

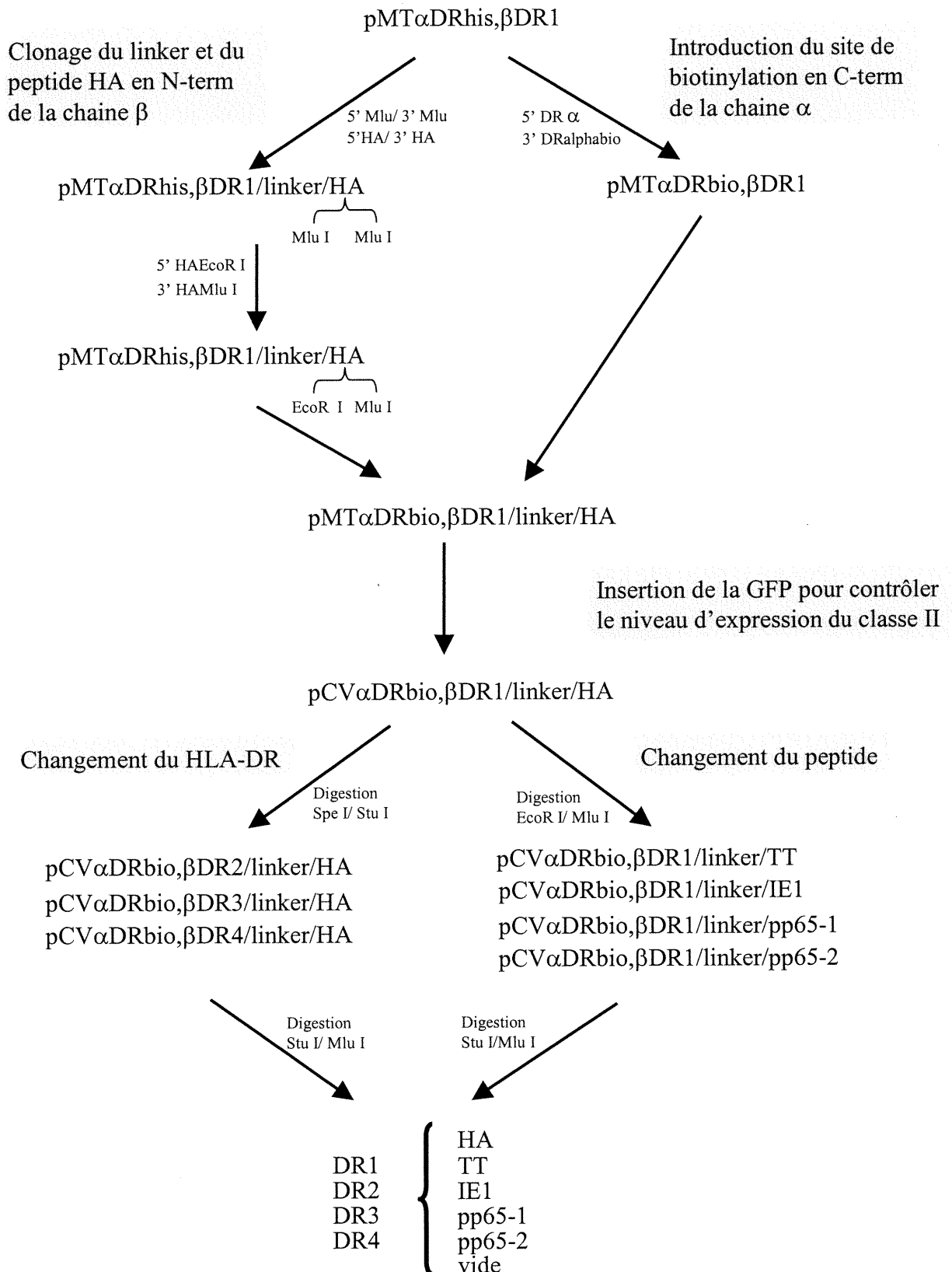


**Profil de digestion des molécules HLA-DR0101, -DR1501, -DR0301 et -DR0401 par les enzymes Afl II/Xba I (A), Xcm I(X), Kpn I (K) et Mse I (M).**





## STRATÉGIE DE CLONAGE



## LISTE DES AMORCES

5'PU	5' GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA 3'	22-mer
3'PR	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	17-mer
5'DRBF'/Spe I	5' TCACTAGTGGGAGGTGGCTCTGGTGGTGGTTCGCGACC ACGTTTCTTG 3'	51-mer
3'DRBF/Pvu II	5' AATGTGGTCAGCTGCATTTTCAGCTCAGGAA 3'	30-mer
5'DRalpha	5' CCTCATCTGTTTCATCGACAAG 3'	22-mer
3'DRalphabio	5' GCGCAGATCTTTATCGATGATTCCACACCATTTTCTGTGCATC CAGAATATGATGCAGGGATCCCTCTGTAGTCTCTGGGAGAGG 3'	85-mer
5'Mlu I	5' GGGGACACGCGTCCACGTTTCTTGTGG 3'	27-mer
3'Mlu I	5' CCACAAGAAACGTGGACGCGTGTCCCC 3'	27-mer
5'HA	5' CGCGTCCCAAGTATGTCAAACAGAATACCCTAAAACCTGGCGA 3'	42-mer
3'HA	5' CGCGTCGCCAGTTTTAGGGTATTCTGTTTGACATACTTGGGA 3'	42-mer
5'HAEcoR I	5' CGCGAATTCCCAAGTATGTCAAACAGAATACCCTAAAACCTGGCGA 3'	45-mer
3'HAMlu I	5' CGCGTCGCCAGTTTTAGGGTATTCTGTTTGACATACTTGGGAATT 3'	45-mer
5'TTEcoR I	5'AATTCAGTATATAAAAAGCAAATTCTAAATTTATAGGTATAACTGAAA3'	47-mer
3'TTMlu I	5'CGCGTTTCAGTTATACCTATAAAATTTAGAATTTGCTTTTATATACTG 3'	47-mer
5'pp65-1EcoR I	5' AATCCCCGAAATGATATCCGTA CTGGGTCCCATTTCGGGGCACGTG CTGA 3'	50-mer
3'pp65-1Mlu I	5' CGCGTCAGCACGTGCCCCGAAATGGGACCCAGTACGGATATCATT CGGG 3'	50-mer
5'pp65-2EcoR I	5'AATTCAGGCCGGCATCCTGGCCCGCAACCTGGTGCCCATGGTGGCTA 3'	47-mer
3'pp65-2Mlu I	5'CGCGTAGCCACCATGGGCACCAGGTTGCGGGCCAGGATGCCGGCCTG3'	47-mer
5'IE1EcoR I	5'AATTCAGATTAAGCTTCGAGTGGACATGGTGCGGCATAGAATC AAGGAGA 3'	50-mer
3'IE1Mlu I	5' CGCG TCTCCTTGATTCTATGCCGCACCATGTCCACTCGAACCT TAATCTG 3'	50-mer
5'EcoDRb	5' CGGAATTCATGGTGTGTCTGAAGCTC 3'	26-mer
3'BamDRb	5' CGGGATCCATACACAGTCACCTTAGG 3'	26-mer

## ANNEXE 10

Résidus d'ancrage des peptides HA<sub>306-318</sub>, TT<sub>830-843</sub>, pp65-1<sub>009-023</sub>,  
pp65-2<sub>488-501</sub> et IE1<sub>088-102</sub>

HA <sub>306-318</sub>	P	K	Y	V	K	Q	N	T	L	K	L	A	T
HLA-DR0101	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9	_	_
HLA-DR1501	_	_	_	1	_	_	4	_	_	7	_	_	_
HLA-DR0301	_	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9	_
HLA-DR0401	_	_	1	_	_	4	_	6	7	_	9	_	_
TT <sub>830-843</sub>	Q	Y	I	K	A	N	S	K	F	I	G	I	T
HLA-DR0101	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9	_	_
HLA-DR1501	_	_	1	_	_	4	_	_	7	_	_	_	_
HLA-DR0301	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9	_	_
HLA-DR0401	_	1	_	_	4	_	6	7	_	9	_	_	_
pp65-1 <sub>009-023</sub>	P	E	M	I	S	V	L	G	P	I	S	G	H
HLA-DR0101	_	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9	_
HLA-DR1501	_	_	1	_	_	4	_	_	7	_	_	_	_
HLA-DR0301	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9	_	_
HLA-DR0401	_	_	1	_	_	4	_	6	7	_	9	_	_
pp65-2 <sub>488-501</sub>	Q	A	G	I	L	A	R	N	L	V	P	M	V
HLA-DR0101	_	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9	_
HLA-DR1501	_	_	1	_	_	4	_	_	7	_	_	_	_
HLA-DR0301	_	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9	_
HLA-DR0401	_	_	_	1	_	_	4	_	6	7	_	9	_
IE1 <sub>088-102</sub>	Q	I	K	V	R	V	D	M	V	R	H	R	I
HLA-DR0101	_	_	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9
HLA-DR1501	_	1	_	_	4	_	_	7	_	_	_	_	_
HLA-DR0301	_	_	_	1	_	_	4	_	6	_	_	9	_
HLA-DR0401	_	_	_	_	1	_	_	4	_	6	7	_	9

Motifs d'ancrage déterminé avec l'algorithme de Rammensee (130).

## ANNEXE 11

## Motifs d'ancrage des molécules HLA-DRB1\*0101 et HLA-DRB1\*1501

HLA-DRB1*0101	Position relative								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Résidus polymorphiques	G <sub>β86</sub>			F <sub>β13</sub> Q <sub>β70</sub> R <sub>β71</sub> A <sub>β74</sub> Y <sub>β78</sub>		L <sub>β11</sub> P <sub>β13</sub>			W <sub>β9</sub> D <sub>β57</sub>
Résidus d'ancrage	Y, V, L, F, I, A, M, W	X	X	L, A, I, V, M, N, Q	X	A, G, S, T, P	X	X	L, A, I, V, N, F, Y
	aro. ali.			ali. pol. no +					ali. aro. pol.

HLA-DRB1*1501	Position relative								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Résidus polymorphiques	V <sub>β86</sub>			R <sub>β13</sub> Q <sub>β70</sub> A <sub>β71</sub>		R <sub>β13</sub> P <sub>β11</sub>	I <sub>β67</sub>		W <sub>β9</sub> D <sub>β57</sub>
Résidus d'ancrage	L, V, I	X	X	F, Y, I	X	X	I, L, V, M, F	X	T
	ali.			hydrophobe aro.		pol. no-	pol.		

## ANNEXE 12

## Motifs d'ancrage des molécules HLA-DRB1\*0301 et HLA-DRB1\*0401

HLA-DRB1*0301	Position relative									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
Résidus polymorphiques	V <sub>β86</sub>			S <sub>β13</sub> Q <sub>β70</sub> L <sub>β71</sub> R <sub>β74</sub> Y <sub>78</sub>		S <sub>β11</sub> S <sub>β13</sub>				E <sub>β9</sub> D <sub>β57</sub>
Résidus d'ancrage	L, I, F, M, V	X	X	D, E	X	K, R, E, Q, N	X	X		Y, L, F
	ali.									ali. aro. pol.

HLA-DRB1*0401	Position relative									
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
Résidus polymorphiques	G <sub>β86</sub>			H <sub>β13</sub> Q <sub>β70</sub> K <sub>β71</sub> A <sub>β74</sub> Y <sub>β78</sub>		V <sub>β11</sub> H <sub>β13</sub> L <sub>β67</sub>				E <sub>β9</sub> D <sub>β57</sub>
Résidus d'ancrage	F, Y, W, I, L, V, M	X	X	F, W, I, L, V, A, D, E	X	N, S, T, Q, H, R	Pol. Chg. Ali.	X		K
	aro. ali.			ali. Aro. pol. pol - no R, K						ali. pol.