

2m 11.2991.4

Université de Montréal

La translocation de B7-2 (CD86) vers les RAFTs est induite suite à l'activation  
du CMH classe II par un superantigène.

par

Ana Carina Da Paula

Département de Microbiologie-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-Immunologie.

Avril 2002

©Ana Carina Da Paula, 2002



W  
4  
U58  
2002  
V.096

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
La translocation de B7-2 (CD86) vers les RAFTs est induite suite à l'activation  
du CMH classe II par un superantigène.

présenté par :  
Ana Carina Da Paula

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Marc Drolet  
Président-rapporteur

Dr Marc Vaillancourt  
Directeur de recherche

Dr Guy Lemay  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

Peu de travaux de recherche ont été menés visant la caractérisation des événements se produisant dans les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). La liaison CPA/cellules T induit l'activation des cascades intracellulaires chez les CPAs impliquant possiblement CD86 dans le complexe protéique. La protéine CD86, est exprimée par les CPAs et est un co-stimulateur essentiel à l'activation des lymphocytes T.

Au cours de cette étude, nous avons d'abord optimisé la technique d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji. Les conditions optimales déterminées, il a été observé via des techniques de Slot blot et d'immunobuvardage (Western Blot), la présence de CD86 dans les RAFTs. Des études subséquentes utilisant un SEA ont été effectuées et la translocation de CD86 dans les RAFTs déterminée lors d'une cinétique d'activation. Un ELISA quantitatif visant à localiser CD86 à la surface des Raji a été effectué. Les résultats indiquent que le SEA transloque CD86 dans les RAFTs en 30 minutes. Une augmentation de 100% de CD86 dans les portions RAFTs a été déterminée à 100ng/ml SEA alors que 1ng/ml SEA n'induit pas cette translocation. Finalement, cette translocation a été visualisée par immunofluorescence permettant de co-localiser CD86-CMH-II. Des études par immunobuvardage supportent aussi cette co-localisation observée. Il est donc possible de stipuler que l'activation des CPAs via l'interaction CMH-II-TCR peut mener à un recrutement simultané de CD86 et CD28. Ce recrutement spécifique de CD86 à la synapse immunologique pourrait entraîner l'activation des CPAs via la présence de kinases/phosphatases associées aux même RAFTs-CD86.

Ce travail est une première démonstration d'un rôle potentiel de CD86 dans l'activation des cascades intracellulaires chez les CPAs via sa localisation dans les RAFTs. Il sera intéressant de poursuivre ces travaux afin d'approfondir nos connaissances sur les protéines affectées et/ou modulées par CD86.

*Mots Clés* : CD86, RAFTs, CPA, CMH-II, SEA, synapse immunologique.

## **ABSTRACT**

Very little is known about the possible activated cascades in antigen presenting cells (APC). The interaction APC/T cell induces the activation of intracellular cascades in APCs, which possibly implicates CD86 in the protein complex. CD86 is expressed in APCs and is a necessary co-stimulatory molecule for full T cell activation.

In the course of this study we have optimized the isolation conditions of RAFTs in Raji cells. After this optimization we observed through Slot Blot and Western Blot the presence of CD86 in RAFTs. Subsequent studies using SEA were performed and the translocation of CD86 in RAFTs determined during an activation kinetic. Quantitative ELISA aimed at localizing CD86 at the cell surface of Raji was performed. The results indicate that SEA induces the translocation in RAFTs of CD86 after 30 minutes. An increase of 100% of CD86 in RAFTs was determined at 100ng/ml SEA while at 1ng/ml SEA does not induce translocation. Finally this translocation was visualized by immunofluorescence, which also indicates co-localization of CD86-MHC-II. Western Blots analysis also supported these results. It is therefore possible to stipulate that the activation of APCs through the interaction MHC-II-TCR will lead to the recruitment of CD86 and CD28. This specific recruitment of CD86 at the immunological synapse may lead to the activation of APCs through the presence of kinases/phosphatases associated with the same RAFTs-CD86.

This study demonstrates the potential role of CD86 in the intracellular cascades on APCs through its localization in RAFTs. It would be very interesting to pursue this work and to investigate the proteins affected by/or associated with CD86.

*Key Words:* CD86, RAFTs, APC, MHC-II, SEA, immunological synapse.

## **TABLE DES MATIÈRES**

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiii
DÉDICACE.....	xvi
REMERCIEMENTS.....	xvii
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le système immunitaire.....	1
1.1.1 Les bases de l'immunité.....	2
1.1.2 La réponse immunitaire.....	2
1.1.3 Les antigènes.....	6
1.1.4 Les anticorps.....	6
1.1.5 La diversité des anticorps.....	10
1.2 Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).....	13
1.3 Les lymphocytes.....	14
1.4 Ontogénie des lymphocytes T.....	14
1.5 Ontogénie des lymphocytes B.....	16
1.6 Signaux d'activation des lymphocytes T.....	17
1.6.1 Structure du récepteur de l'antigène et voies de signalisation.....	17
1.6.2. Les superantigènes.....	21
1.6.3. La famille Src.....	22
1.6.4 Protéine tyrosine phosphatase (CD45) et Protéines tyrosine kinase (Zap-70).....	26
1.7 Signaux d'activation des lymphocytes B.....	27
2. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE.....	29
3. LES MOLÉCULES DE CO-STIMULATION CD80 et CD86.....	30

3.1 Rôle des molécules de co-stimulation dans l'induction d'une réponse immune T dépendante.....	34
4. SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE .....	35
5. RAFTs : radeaux lipidiques ou microdomaines distincts de la membrane plasmique.....	38
6. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....	43
7. TECHNIQUES UTILISÉES.....	45
7.1 Cytométrie en Flux.....	45
7.2 SDS-PAGE et Immunodétection .....	46
7.3 Slot Blot.....	47
7.4 ELISA.....	47
7.5 Immunofluorescence .....	48
8. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	49
8.1 Culture cellulaire.....	49
8.2 Décompte cellulaire .....	49
8.3 Méthodes de préservation des cellules : Congélation et Décongélation.....	50
8.4 Cytométrie en Flux ou FACS .....	50
8.4.1 Préparation des cellules pour le FACS .....	51
8.5 Marquage de surface .....	51
8.6 Isolement des RAFTs .....	52
8.7 Activation des cellules Raji par le SEA .....	52
8.8 Protocole optimisé de l'isolement des RAFTs .....	53
8.9 Slot Blot.....	56
8.10 SDS-PAGE .....	57
8.11 Transfert sur membrane PVDF .....	57
8.12 Immunodétection .....	58
8.13 ELISA.....	59
8.14 Immunofluorescence .....	59
9. RÉSULTATS .....	61

9.1 Optimisation du protocole d'isolement des RAFTs.....	61
9.1.1 Augmentation cellulaire du protocole d'isolement des RAFTs .....	63
9.1.2 Variation du volume de tampon de lyse du protocole d'isolement des RAFTs.....	65
9.1.3 Variation du temps d'incubation de la lyse cellulaire du protocole d'isolement des RAFTs.....	68
9.1.4 Résumé de l'optimisation du protocole d'isolement des RAFTs .....	70
9.2 Séparation par SDS-PAGE et analyse par immunobuvardage de la présence de CD86 (B7-2) dans les fractions RAFTs.....	72
9.3 Séparation par SDS-PAGE et analyse par immunobuvardage de la présence de CD86 (B7-2) et CMH-II dans les fractions RAFTs suivant une cinétique d'activation par un superantigène (SEA) à une concentration de 100ng/ml.....	74
9.4 Marquage protéique de surface.....	78
9.4.1 Quantification de CD86 de surface sur les cellules Raji lors d'une cinétique d'activation du SEA à 1ng/ml et 100ng/ml.....	79
9.5 Immunofluorescence des cellules Raji : Cholératoxine-FITC et CD86-PE.....	88
9.6 Immunofluorescence des cellules Raji : CMH-II-FITC et CD86-PE .....	91
10. DISCUSSION.....	95
10.1 Optimisation du protocole d'isolement et RAFTs par Slot Blot ...	96
10.2 Analyse par SDS-PAGE puis immunobuvardage de la présence de CD86 (B7-2) et CMH-II dans les fractions RAFTs suivant une cinétique d'activation par le SEA à une concentration de 100ng/ml. .....	100
10.3 Marquage de surface.....	103

10.3.1 Slot Blot et ELISA des cellules Raji activées par une cinétique de SEA à 1ng/ml et de 100ng/ml.....	103
10.4 Immunofluorescence.....	104
10.4.1 Immunofluorescence des cellules Raji : Cholératoxine-FITC et CD86-PE.....	105
10.4.2 Immunofluorescence des cellules Raji : CMH-II-FITC et CD86-PE.....	105
11. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	107
12. BIBLIOGRAPHIE.....	109

**LISTE DES FIGURES**

FIGURE 1 : Représentation schématique des cytokines influençant le développement des lymphocytes T auxiliaires en cellules Th1 ou Th2. ....	4
FIGURE 2 : Structure schématique et structure cristallographique de base d'une immunoglobuline.....	8
FIGURE 3 : Représentation schématique de la production d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde chez la souris.....	11
FIGURE 4 : Représentation schématique du TCR $\alpha\beta$ .....	19
FIGURE 5 : Mécanisme d'activation et d'inactivation des membres de la famille Src.....	25
FIGURE 6 : Schéma d'une synapse immunologique.....	31
FIGURE 7 a: Représentation schématique de la structure de CD80 (B7-1)/CD86 (B7-2) et de CD28/CTLA-4. ....	32
FIGURE 7 b : Structure de CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2).....	33
FIGURE 8 : Structure de la membrane plasmique selon le modèle de la mosaïque fluide. ....	40
FIGURE 9 : Structures d'une molécule de cholestérol et de sphingolipide formant les RAFTs. ....	42

FIGURE 10 : Isolement des Rafts par un détergent non ionique suivie d'une centrifugation par gradient de densité sur saccharose.....	55
FIGURE 11: Optimisation de la technique d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par Slot Blot des conditions standards.....	62
FIGURE 12: Optimisation de la technique d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : Analyse par Slot Blot de la variation de la concentration de cellules.....	64
FIGURE 13 : Optimisation de la technique d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par Slot Blot de la variation du volume de lyse.....	67
FIGURE 14 : Optimisation de la technique d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par Slot Blot de la variation du temps d'incubation de la lyse.....	69
FIGURE 15 : Condition optimale d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par Slot Blot.....	71
FIGURE 16 : Condition optimale d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par immunobuvardage de la présence de CD86.....	73
FIGURE 17 : Cinétique d'activation dans les cellules Raji (0, 5, 15 et 30 minutes) par un SEA à 100ng/ml : analyse par immunobuvardage de la présence d'un CD86.....	75
FIGURE 18 : Cinétique d'activation dans les cellules Raji (0, 5, 15 et 30 minutes) par un SEA à 100ng/ml : analyse par immunobuvardage de la présence du CMH-II.....	76

FIGURE 19 : Contrôle positifs et négatif d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par immunobuvardage de la présence d'un CD40, CD45 et de l'actine.....77

FIGURE 20: Design expérimental du marquage protéique de surface.....78

FIGURE 21a : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 15, 30 et 60 minutes) avec un SEA à 100ng/ml : analyse par Slot Blot du CD86-HRP.....80

FIGURE 21b : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 30 et 60 minutes) avec un SEA à 1ng/ml : analyse par Slot Blot du CD86-HRP.....81

FIGURE 22a : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 15, 30 et 60 minutes) par un SEA à 100ng/ml : quantification par ELISA d'un CD86 de surface.....83

FIGURE 22b : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 30 et 60 minutes) par un SEA à 1ng/ml : quantification par ELISA d'un CD86 de surface.....84

FIGURE 23a : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 15, 30 et 60 minutes) par un SEA à 100ng/ml : quantification par ELISA d'un CD86 de surface ou les fractions RAFTs ont été réunies ensemble.....86

FIGURE 23b : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 30 et 60 minutes) par un SEA à 1ng/ml : quantification par ELISA d'un CD86 de surface ou les fractions RAFTs ont été réunies ensemble.....87

FIGURE 24 : Co-localisation de CD86 et des RAFTs par immunofluorescence.....90

FIGURE 25 : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 5, 15, 30, 60 et 90 minutes) par un SEA à 1ng/ml : co-localisation de CD86 et du CMH-II par immunofluorescence.....93

FIGURE 26 : Co-localisation de CD86 et CMH-II des contrôles isotypiques CD86 et CMH-II par un SEA à 1ng/ml pendant 30 minutes.....94

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
BCR	<i>B cell receptor</i> (récepteurs des cellules B)
CD3	<i>Cluster</i> de différenciation 3
C <sub>H</sub>	Région constante
C <sub>L</sub>	Région constante unique
CMF	Cytomètre de flux
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
<i>coll.</i>	Collègues
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fœtal calf serum</i> (Sérum foetal de veau)
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
g	Gramme
g	pour la centrifugation : représente 9,8m/s <sup>2</sup>
GEM	<i>Glycosphingolipid enriched membranes</i>
GM1	<i>Raft Lipid</i> Ganglioside 1
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
HRP	<i>Horse Radish Peroxydase</i> ou Peroxydase de Raifort
IFN-γ	Interféron-gamma
Ig	Immunoglobuline
IgA	Immunoglobuline A

IgD	Immunoglobuline D
IgE	Immunoglobuline E
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL-2	Interleukine-2
IL-4	Interleukine-4
IL-5	Interleukine-5
IL-6	Interleukine-6
IL-10	Interleukine-10
IL-12	Interleukine-12
IL-13	Interleukine-13
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
kDa	Kilodalton
µg	Microgramme
µg/ml	Microgramme par millilitre
µl	Microlitre
ml	Millilitre
mM	Millimolaire ou millimole par litre
M	Molaire
ME	<i>Mercaptoéthanol</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MHC-I	<i>Major histocompatibility complex class I</i>
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex class II</i>
min	Minute
MW std.	<i>Molecular weight standard</i> ou standard de poids moléculaire
ng/ml	Nanogramme par millilitre
PBS	<i>Phosphate buffer salin</i> ou Tampon phosphate salin
PE	Phycoérythrine
PKC	Protéine Kinase C
PLCγ	Phospholipase Cγ

RAFTs	Radeaux lipidiques ou microdomaines glycosphingolipidiques
RPM	Rotation par minute
SDS-PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate</i> ou Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SEA	<i>Staphylococcal Enterotoxin A</i>
SI	Système immunitaire
SMAC	<i>Supra Molecular Activation Complexes</i>
Tc	Lymphocytes T cytotoxique
T CD8 <sup>+</sup>	Lymphocytes T cytotoxique
T CD4 <sup>+</sup>	Lymphocytes T auxiliaire ou <i>helper</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> (récepteur des cellules T)
Th	Lymphocytes T <i>helper</i> ou auxiliaire
Th-1	Lymphocytes T auxiliaires de type 1
Th-2	Lymphocytes T auxiliaires de type 2
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
V	Volt
V <sub>L</sub>	Région variable unique
V <sub>H</sub>	Région variable

**DÉDICACE**

À mes parents et à Jorge Correia

## REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur le Dr Marc Vaillancourt, qui d'une part m'a initiée à la recherche et d'autre part a grandement contribué au développement de ma curiosité scientifique. Je le remercie sincèrement pour tous les conseils prodigués au cours de ces années ainsi que pour son amitié.

Je tiens également à remercier Fabienne Vozy pour les conseils prodigués dans lesquels je puiserai toujours les éléments nécessaires à la poursuite de ma carrière scientifique.

Je remercie également la direction du département de Microbiologie et Immunologie ainsi que la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal de m'avoir acceptée comme candidate à la Maîtrise es Sciences.

Merci au jury soit le Dr Marc Drolet ainsi que le Dr Guy Lemay pour l'évaluation de ce mémoire.

Mille fois merci à Xuan Chi-Han Nguyen pour avoir enduré mes sautes d'humeur lors de la rédaction de ce mémoire mais surtout pour son amitié qui m'est très chère.

Un merci tout spécial à mes parents dont le support inconditionnel a beaucoup contribué à l'aboutissement de cette première étape de mon cheminement dans le monde scientifique.

Finalement je tiens également à remercier mon fiancé, Jorge Correia, pour ses encouragements constants, pour sa compréhension mais surtout pour son amour.

## **1. INTRODUCTION**

### 1.1 Le système immunitaire

L'immunologie origine de la bactériologie. La découverte des agents microbiens vers la fin du 19<sup>ième</sup> siècle a mené à la recherche de moyens d'augmenter la résistance des individus contre ces agents et, dans un deuxième temps, de prévenir ces infections grâce à la vaccination. L'étude des mécanismes mis en jeu par l'organisme pour rencontrer ces objectifs a représenté les premiers fondements de l'immunologie (Prescott *et al.*, 1995). Or, l'organisme dispose d'un mécanisme de reconnaissance de ses propres constituants (soi) et des substances étrangères qui peuvent y entrer (non-soi). Ainsi, une des fonctions de la réponse immunitaire chez les animaux supérieurs est de fournir une protection spécifique (immunité) contre des microorganismes, des cellules cancéreuses ou encore toutes substances étrangères communément appelées antigènes (immunogènes) (Abbas *et al.*, 1997).

De manière générale, le système immunitaire (SI) peut se diviser en deux types cellulaires distincts : les cellules présentatrices d'antigène (CPA), c'est-à-dire celles qui présentent un antigène (Ag) afin de générer une réponse immunitaire, et celles qui sont effectrices de la réponse immunitaire (Abbas *et al.*, 1997). La majorité des études visant à comprendre le SI se sont concentrée à l'étude de l'action des lymphocytes T alors que très peu de données scientifiques ont relaté l'activation des CPAs. Ainsi, l'activation des cellules T servira de base à ces travaux et par analogie une compréhension des mécanismes régulant l'activation des CPAs sera proposée.

### 1.1.1 Les bases de l'immunité

Plusieurs types cellulaires tels que les CPAs et les cellules effectrices jouent un rôle important pour le fonctionnement du SI. C'est en fait l'interaction entre ces divers types cellulaires qui permet une réponse immunologique efficace contre les substances étrangères. Toutes les cellules du SI proviennent de cellule souche suivant 2 voies principales de différenciation : 1) la lignée myéloïde qui conduit aux phagocytes, entre autres, et 2) la lignée lymphoïde qui engendre les lymphocytes T tels que les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Abbas *et al.*, 1997).

Les lymphocytes sont des cellules clés de la réponse immunitaire spécifique et se répartissent en deux grandes populations: les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces deux populations se distinguent par leurs origines ainsi que par des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles. Les deux populations naissent dans la moelle osseuse, mais les précurseurs des lymphocytes T migrent dans le thymus pour y mûrir et y acquérir leur immuno-compétence, tandis que les lymphocytes B mûrissent dans la moelle osseuse.

### 1.1.2 La réponse immunitaire

Les mécanismes d'immunité innée permettent de faire face à un monde extérieur abondant en microorganismes et agissent de façon non spécifique : immunité naturelle alors que les mécanismes d'immunité acquise se développent en réponse à une stimulation antigénique.

Il existe deux types de réponses immunitaires lors de l'immunité acquise : 1) la réponse immunitaire à médiation cellulaire et 2) la réponse immunitaire à médiation humorale. La réponse immunitaire d'un organisme vis-à-vis un agent étranger se produit par une série de signal provoquée par le

contact entre un Ag et un lymphocyte reconnaissant spécifiquement cet Ag. Des signaux régulateurs de la réponse immunologique seront émis de telle sorte que les cellules effectrices spécifiques, Th-1 (lymphocytes T auxiliaires de type 1) ou d'anticorps, Th-2 (lymphocytes T auxiliaires de type 2) proliféreront (voir ci-après pour leur description).

Les lymphocytes T peuvent être divisés en deux sous-types principaux : les lymphocytes T  $CD8^+$  et les lymphocytes T  $CD4^+$ . Les lymphocytes T  $CD8^+$  sont des cellules cytotoxiques responsables de l'élimination des cellules tumorales ou infectées par un virus alors que les lymphocytes T  $CD4^+$  sont des cellules auxiliaires. Les lymphocytes T  $CD4^+$  se sous-divisent selon la nature des cytokines (protéines) qu'ils produisent et peuvent se diviser en deux autres catégories : les Th1 (lymphocytes T auxiliaires de type 1) et les Th2 (lymphocytes T auxiliaires de type 2). La différenciation des lymphocytes T auxiliaires en cellules Th1 ou Th2 se fait au tout début de la réponse immunitaire (Figure 1). Les Th1 produisent l'interleukine 2 (IL-2) et l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) qui permettent d'activer la fonction des lymphocytes T  $CD8^+$ . L'IFN- $\gamma$  permet également de réguler la fonction des lymphocytes  $CD4^+$  Th2, particulièrement pour ce qui est de la production des immunoglobulines E (IgE). Les Th2 produisent l'IL-4 (qui aide les lymphocytes B à produire les IgE), l'IL-6 (qui aide ces mêmes lymphocytes à produire d'autres anticorps), l'IL-5 (qui permet de provoquer la production des éosinophiles) et l'IL-10 qui contrôle la fonction des Th1. L'IL-12 est une cytokine produite principalement par les macrophages qui joue un rôle important au plan de la différenciation des lymphocytes  $CD4^+$  Th0 en Th1 (Abbas *et al.*, 1997).

**FIGURE 1 : Représentation schématique des cytokines influençant le développement des lymphocytes T auxiliaires en cellules Th1 ou Th2.**

Les lymphocytes Th1, produisent IL-2 et de l'INF- $\gamma$ . Les lymphocytes Th2, quant à eux, produisent de l'IL-4, 5, 10, 13. Les lymphocytes Th1 sont les principaux effecteurs de l'immunité à médiation cellulaire spécifique d'antigène alors que les lymphocytes Th2 ont un rôle prépondérant dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Finalement, les lymphocytes de types Th1 et Th2 ont un rôle antagoniste c'est-à-dire que les cytokines produites par les Th1 inhibent le développement des lymphocytes Th2 alors que les cytokines produites par les Th2 inhibent le développement d'une réponse Th1.



### 1.1.3 Les antigènes

Un antigène est toute substance étrangère, naturelle ou synthétique reconnue par le SI. Chaque antigène peut avoir plusieurs déterminants antigéniques ou épitopes. Les déterminants antigéniques sont les domaines de la molécule qui stimulent la production des anticorps spécifiques alors que les épitopes sont les domaines qui se combinent aux anticorps. En général, les déterminants antigéniques des antigènes protéiques ont une taille correspondant de 2 à 11 acides aminés (Abbas *et al.*, 1997).

### 1.1.4 Les anticorps

Les anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines présentes dans le sérum sanguin et les liquides tissulaires des vertébrés. Ils se lient avec le déterminant antigénique qui a provoqué leur formation. Ils sont produits par les lymphocytes B et leur descendant soit les plasmocytes.

Malgré leur hétérogénéité, les immunoglobulines, sont produites selon un modèle de base soit 4 chaînes polypeptidiques unies entre elles par des ponts disulfures (Figure 2). Ce tétramère se compose de 2 chaînes lourdes (H) de 55 kD et de 2 chaînes légères (L) de 25 kD. Il existe deux types de chaînes légères communes à toutes les Ig soit le type kappa ( $\kappa$ ) et le type lambda ( $\lambda$ ) mais un seul de ces deux types peut se retrouver sur une même molécule Ig. Par contre, les chaînes lourdes sont spécifiques à chaque classe d'Ig. Il est possible de distinguer chez la plupart des mammifères 5 classes d'Ig : IgG, IgM, IgA, IgD et IgE. Chaque type d'anticorps diffère selon leur charge, leur composition en sucre et leur composition en acides aminés. De ce fait, les chaînes légères comme les chaînes lourdes contiennent deux régions différentes : les régions constantes ( $C_L$  ou  $C_H$ ) et des régions variables ( $V_L$  ou

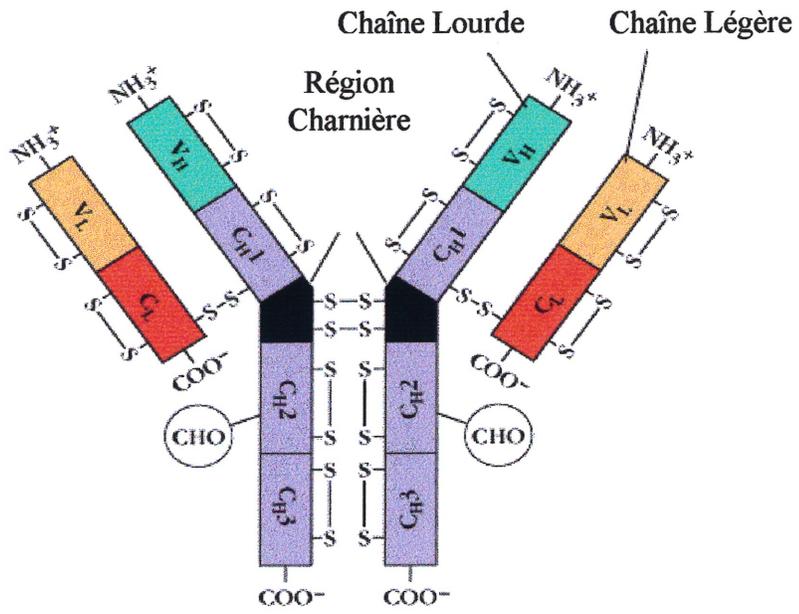
$V_H$ ). Les régions constantes ( $C_L$  ou  $C_H$ ) ont des séquences d'acides aminés qui ne varient pas de façon significative entre les anticorps d'une même sous-classe. Les régions variables ( $V_L$  ou  $V_H$ ) possèdent des séquences d'acides aminés différentes et déterminent la spécificité de l'Ac et seront responsables de sa fixation à l'Ag alors que les régions constantes déterminent les propriétés métaboliques et effectrices de l'Ac (Prescott *et al.*, 1995).

**FIGURE 2 : Structure schématique et structure cristallographique de base d'une immunoglobuline.**

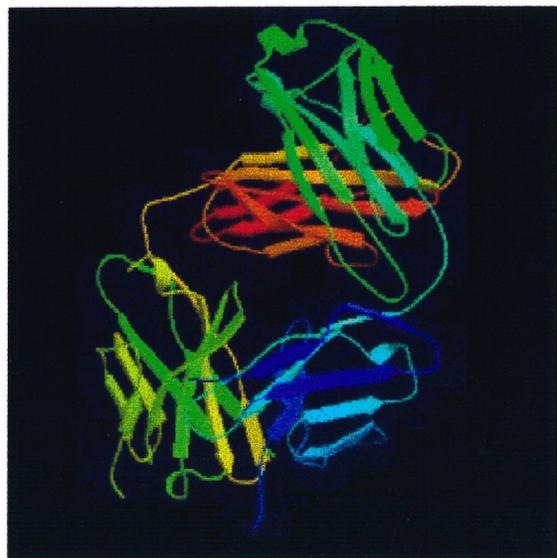
a) La molécule est constituée de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes identiques maintenues par des ponts disulfures. Toutes les chaînes légères contiennent un domaine variable unique ( $V_L$ ) et un domaine constant unique ( $C_L$ ). Les chaînes lourdes contiennent un domaine variable ( $V_H$ ) et de trois à quatre domaines constants ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  et  $C_{H4}$ ). On note une région charnière entre les segments  $C_{H1}$  et  $C_{H2}$  de la chaîne lourde offrant une certaine flexibilité permettant une variation de la distance entre les deux sites de liaison antigénique.

b) La structure cristallographique représente la région variable et la région constante d'une IgG (Référence PDB : 1AXT). Les immunoglobulines sont des protéines multimériques où chaque chaîne légère est associée à une chaîne lourde par un pont disulfure intercaténaire. Il en est de même entre les deux chaînes lourdes au niveau de la région charnière. Ces chaînes sont repliées en domaines de type sandwich  $\beta$  d'environ 110 acides aminés, menant à une superposition de 2 feuillets maintenue essentiellement par un pont disulfure intracaténaire et par interactions hydrophobes.

a.



b.



### 1.1.5 La diversité des anticorps

Les cellules productrices d'Acs possèdent des mécanismes moléculaires leur permettant de générer une diversité presque infinie d'Acs reconnaissant les différents épitopes des Ags. Cette diversité est générée par un réarrangement de segments des gènes d'anticorps, par mutations somatiques et par génération de différents codons lors de la jonction des gènes d'anticorps (Figure 3). De ce fait, les gènes d'Ig sont des gènes morcelés formés de plusieurs exons. L'ADN (acide désoxyribonucléique) de la lignée germinale codant pour la chaîne légère contient des séquences codantes multiples appelées régions V et J. C'est au cours de la différenciation d'une cellule B qu'une délétion se produit qui joint un exon V à un exon J. Ce processus de réarrangement de l'ADN est appelé réarrangement combinatoire car il permet la création de nombreuses combinaisons entre les régions V et J (Figure 3a).

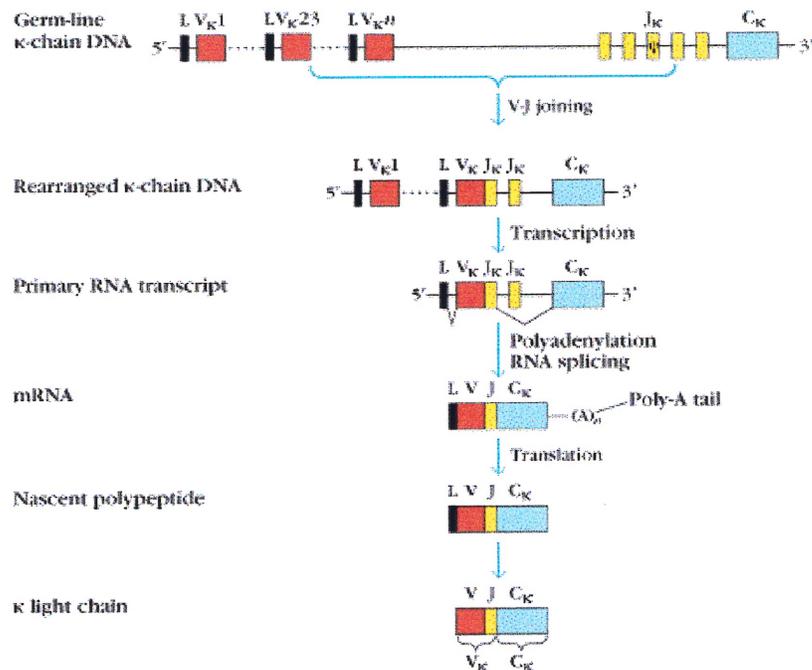
C'est également un réarrangement combinatoire qui est à l'origine de la formation d'une chaîne lourde (Figure 3b). Ce réarrangement se produit par jonction de l'ADN des régions V et J de la chaîne lourde à une troisième séquence le segment D. Finalement, une autre translocation d'ADN rejoint la région VJD à une région différente qui peut par la suite changer la classe de l'Ac produit par la cellule B. La diversité des anticorps peut également être expliquée par un réarrangement de segments des gènes d'anticorps et par mutations somatiques. Les régions V sont sujettes à un taux élevé de mutations somatiques au cours du développement des cellules B dans la moëlle osseuse. Ces mutations donnent donc lieu à la formation de régions V différentes. Tandis qu'au cours du réarrangement combinatoire, la jonction entre VJ ou VDJ peut se faire entre différents nucléotides et générer ainsi différents codons.

**FIGURE 3 : Représentation schématique de la production d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde chez la souris.**

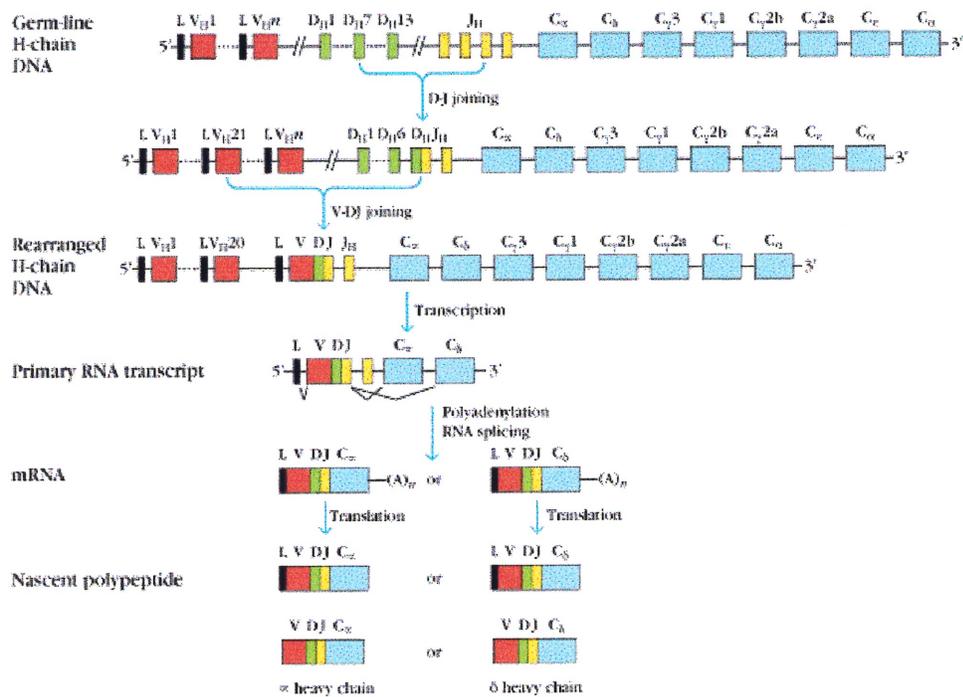
a) La chaîne légère est transcrite d'une délétion qui joint un exon V à un exon J puis la transcription continue sur l'ADN encodant la portion constante du gène et les régions VJ et C sont alors reliées par épissage alternatif de l'ARN transcrit donnant naissance à l'ARN messager.

b) La chaîne lourde est transcrite d'une délétion qui joint les régions V et J à une séquence puis une autre translocation d'ADN rejoint la région VDJ à une région constante différente qui peut par la suite changer la classe de l'anticorps produit.

a.



b.



## 1.2 Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Les lymphocytes reconnaissent les antigènes lorsque ces derniers sont présentés par des complexes protéiques spécifiques. Les lymphocytes T répondent à l'Ag seulement lorsqu'il est présenté à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène par ce complexe protéique et non lorsque l'Ag est libre. Le complexe protéique présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène est le CMH.

Il existe deux types de molécules du CMH soit le CMH de classe I et le CMH de classe II. Le CMH-I est retrouvé sur toutes les cellules nucléées en association avec la  $\beta$ -2-microglobuline et joue un rôle dans la reconnaissance d'un motif antigénique exprimé à la surface d'une cellule cible par le TCR de la cellule T cytotoxique. Le CMH-I est responsable du phénomène de rejet des cellules puisqu'il présente aux cellules effectrices (Th1) des protéines intracellulaires. Ainsi, les cellules infectées par des agents parasitaires tels que les virus, protozoaires etc. seront éliminés, empêchant ainsi la propagation de l'agent infectieux. De manière générale, CMH-I est aussi responsable des pathologies associées aux rejets des tissus du soi ainsi que de la reconnaissance du soi.

La molécule du CMH-II est principalement retrouvée sur des cellules spécialisées tels que macrophages, cellules dendritiques, cellules B, cellules épithéliales thymiques pour ne nommer que celles là. Un des rôles du CMH-II se situe dans la présentation du peptide antigénique par la cellule présentatrice d'antigène au TCR (récepteur des cellules T) de la cellule T auxiliaire. De plus, la présentation de l'Ag/CMH-II à la surface des CPAs aux lymphocytes T résulte en une production de IL-2 si la cellule T reconnaît via son TCR le peptide comme antigène et conjointement à la présence de signaux provenant

de protéines co-stimulatrices B7-1(CD80) et B7-2(CD86) (cette notion sera détaillée un peu plus tard).

### 1.3 Les lymphocytes

La fonction principale des lymphocytes est la reconnaissance des déterminants antigéniques ou épitopes grâce à des récepteurs spécifiques d'antigènes: le TCR sur les lymphocytes T, et le BCR ("B cell receptor") sur les lymphocytes B. Chaque lymphocyte a une spécificité restreinte à un seul épitope. Les lymphocytes T ne peuvent reconnaître que des épitopes peptidiques primaires présentés par les CPAs.

Les lymphocytes T sont caractérisés par la présence sur leur membrane, de "marqueurs" comme la molécule CD3 ("Cluster de différenciation" 3). D'autres marqueurs permettent de distinguer au sein des lymphocytes T deux sous-populations : lymphocytes Th (T "helper" ou T "auxiliaires") porteurs du marqueur  $CD4^+$  et lymphocytes T cytotoxiques (Tc) porteurs du marqueur  $CD8^+$ .

Les lymphocytes T  $CD4^+$  permettent la stimulation et l'activation d'autres populations lymphoïdes, notamment les lymphocytes Tc et les lymphocytes B. Ils peuvent aussi être à l'origine de réactions inflammatoires locales. Les lymphocytes T  $CD8^+$  lysent les cibles cellulaires porteuses de l'épitope qui a activé les lymphocytes.

### 1.4 Ontogénie des lymphocytes T

Les macrophages proviennent du monocyte se sont des phagocytes professionnels c'est-à-dire qu'ils sont capables d'intégrer des particules indésirables et d'adhérer à diverses surfaces. Le rôle des macrophages est donc

de phagocyter ou d'induire une lyse de cellules indésirables, de sécréter des substances biologiquement actives (complément, interleukines, etc.) et de capter puis de présenter l'antigène aux lymphocytes (Abbas *et al.*, 1997).

Les cellules dendritiques, quant à elles, sont des cellules adhérentes mais non phagocytaires. Elles possèdent des prolongements en forme de dendrites et sont capables de se lier aux lymphocytes et de présenter l'antigène aux lymphocytes (Abbas *et al.*, 1997).

La reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T s'effectue au moyen de récepteurs spécifiques (TCR), dont la diversité structurale est générée par recombinaison somatique de manière similaire aux anticorps. À la différence des lymphocytes B dont les antigènes peuvent être reconnus sous une forme native, les lymphocytes T reconnaissent des antigènes sous forme peptidique. Cette capacité de reconnaître les antigènes est la conséquence d'un processus sélectif intrathymique (sélection positive), qui favorise le développement des thymocytes capables d'interagir avec des complexes CMH : peptides. À ce processus sélectif s'ajoute une élimination des thymocytes autoréactifs (sélection négative), conférant aux lymphocytes T la capacité de distinguer ses propres constituants (soi) des substances étrangères (non-soi) (Abbas *et al.*, 1997).

Lors de la sélection positive, les thymocytes expriment à la fois les co-récepteurs CD4 et CD8. Le processus de sélection intrathymique mènera à la perte d'un des 2 co-récepteur, et les thymocytes migreront dans le système périphérique. Ainsi, les cellules matures  $CD4^+ CD8^-$  reconnaissent uniquement des peptides présentés par les molécules de classe II du CMH, ce qui confère une spécificité unique menant à des cellules T auxiliaires sécrétrices de cytokines. Les cellules T  $CD4^- CD8^+$  reconnaissent des peptides uniquement présentés par les molécules de classe I du CMH et sont programmées pour

devenir des lymphocytes T cytotoxiques. De ce fait, la sélection positive détermine le phénotype de surface ainsi que le potentiel fonctionnel des cellules T matures en sélectionnant le co-récepteur approprié (Abbas *et al.*, 1997). Ce mécanisme de sélection a été démontré chez un modèle murin par les mêmes auteurs.

### 1.5 Ontogénie des lymphocytes B

La sélection clonale se déroule en deux phases distinctes dans la vie de la cellule B. Lors de la phase indépendante de la présence d'Ag (lymphopoïèse), l'organisme produit un nombre très élevé de cellules B, chacune avec sa propre spécificité. Si au cours de sa vie une cellule B rencontre un antigène qui s'attache aux Ig de sa surface, la cellule entre alors dans la phase dépendante de la présence de l'Ag (immunopoïèse), qui l'engage à maturer en plasmocytes et à produire des anticorps. D'autre part, l'activation engendre aussi la formation de cellules B mémoire (Abbas *et al.*, 1997).

Les cellules B se développent à partir des cellules souches lymphoïdes dans le tissu hématopoïétique du foie fœtal à partir de 8 à 9 semaines de gestation chez l'Humain. Le foie fœtal est ensuite relayé par la moëlle osseuse ou la lymphopoïèse B a lieu dans l'os spongieux. La maturation s'effectue de l'endosteum vers le sinus veineux central. Les progéniteurs immatures, au contact des cellules endostéales, se différencient en cellules pré-B qui, en grande majorité, meurent par apoptose et sont phagocytées par les macrophages. Les cellules sélectionnées poursuivent leur différenciation pour atteindre le sinus veineux central ou le microenvironnement des cellules réticulaires joue un rôle essentiel dans la différenciation des cellules B.

## 1.6 Signaux d'activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes par leur TCR. Ce signal de reconnaissance extracellulaire doit être converti en une série de signaux intracellulaires. Ce phénomène est appelé transduction de signal. Le signal intracellulaire active plusieurs voies de transduction dont une des étapes ultimes est l'activation de gènes codant spécifiquement pour des facteurs de transcriptions à l'intérieur du noyau résultant en l'induction de l'expression de certains gènes.

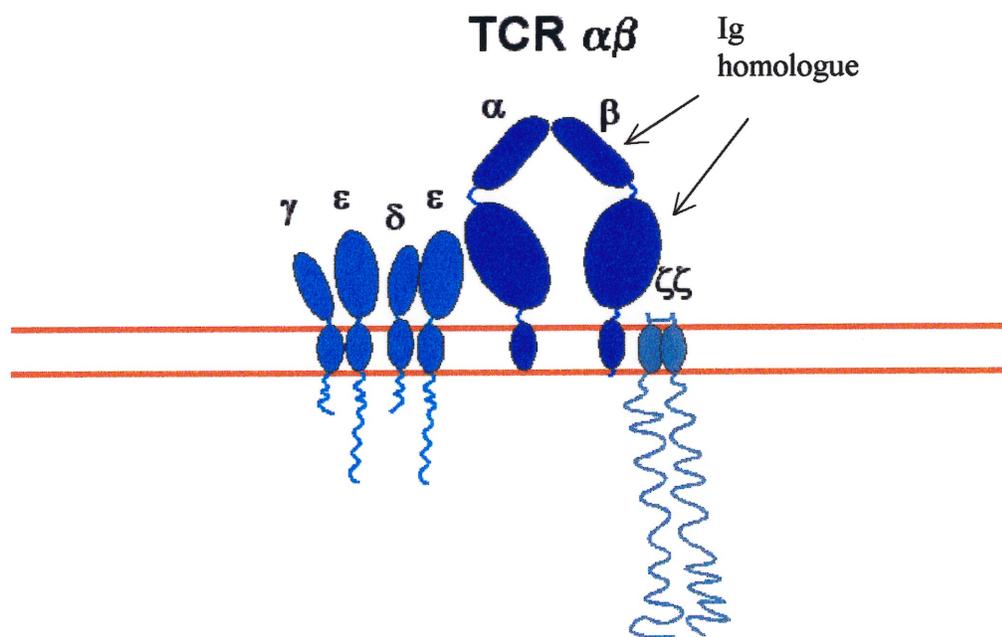
### *1.6.1 Structure du récepteur de l'antigène et voies de signalisation*

Le TCR est un complexe multiprotéique composé d'une unité de reconnaissance : l'hétérodimère  $\alpha\beta$  associé à des protéines accessoires impliquées dans l'initiation de la transduction du signal (Figure 4). Ces protéines forment le complexe CD3 composé lui-même de plusieurs chaînes distinctes : CD3 $\epsilon$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\gamma$  et CD3 $\zeta$ . La stœchiométrie du complexe n'est pas clairement définie, toutefois, il semble que chaque unité de reconnaissance  $\alpha\beta$  soit associée avec deux hétérodimères CD3 $\epsilon$ /CD3 $\delta$  et CD3 $\gamma$ /CD3 $\zeta$  (Acuto et Cantrell, 2000). Le complexe CD3 est indispensable à l'expression membranaire des chaînes  $\alpha\beta$  et à la transduction du signal à partir du TCR. Les sous-unités de CD3 ressemblent aux Ig $\alpha$  et aux Ig $\beta$  du BCR. Elles comportent dans leur région intracytoplasmique des motifs ITAM (« immunoreceptor tyrosine-based activation motif »). Ces ITAM ont une structure composée de deux tyrosines séparées par 13 acides aminés. La séquence consensus des ITAM est YXX[L/V]X<sub>7-11</sub>YXX[L/V] où Y est une tyrosine, L une leucine, V une valine et X n'importe quel acide aminé (Wange et Samelson, 1996 ; Cantrell, 1996 ; Van Leeuwen et Samelson, 1999).

Lorsque l'antigène complexé avec le CMH-II se lie au TCR, les ITAM sont phosphorylés par les protéines tyrosines kinases associées aux co-récepteurs CD4 et CD8. Si les sous-unités CD3 $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\gamma$  possèdent un seul motif ITAM dans leur région intracytoplasmique, ce motif est répété trois fois dans la chaîne  $\zeta$  du CD3. De cet arrangement, le TCR est associé à 10 motifs ITAM. La cohésion du complexe est assurée par la présence de résidus chargés négativement au niveau de la région transmembranaire des chaînes du CD3 qui peuvent interagir avec les résidus chargés négativement présents dans les régions transmembranaires des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR (Cantrell, 1996 ; Acuto et Cantrell, 2000 ; Wange et Samelson, 1996 ; Van Leeuwen et Samelson, 1999).

**FIGURE 4 : Représentation schématique du TCR  $\alpha\beta$ .**

Le TCR  $\alpha\beta$  se compose d'un pont disulfure entre les sous-unités  $\alpha$  (40-50 kDa) et  $\beta$  (35-47 kDa). Chaque chaîne polypeptidique comprend deux régions homologues aux domaines des immunoglobulines et est ancrée dans la membrane plasmique par un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. La variabilité de la séquence en acides aminés réside dans le domaine N-terminal des polypeptides  $\alpha$  et  $\beta$  qui présente des homologies avec les domaines variables des Ig. La chaîne  $\alpha$  est codée par le réarrangement des segments de gènes V et J et la chaîne  $\beta$  par le réarrangement des segments de gènes V, D et J (Davis et Bjorkman, 1988). La reconnaissance de l'antigène implique les parties N-terminales des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Elle permet au récepteur de reconnaître un antigène présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité. La partie invariante du récepteur T (TCR) est composée de différentes chaînes ( $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  et  $\zeta$ ) appelées CD3.



L'activation des cellules nécessite également l'engagement d'autres récepteurs de surface. Ce modèle est défini comme « le modèle à deux signaux ». Il sera mieux défini dans les sections subséquentes, mais brièvement ce modèle propose que l'activation des cellules T nécessite un signal provenant du TCR et un signal provenant des molécules co-stimulatrices. (Shaw et Dustin, 1997).

Il a été décrit qu'aux points de contact du lymphocyte T avec la CPA, une oligomérisation du TCR, stabilisée par des molécules co-réceptrices et de co-stimulation, serait à l'origine des événements de signalisations intracellulaires consécutifs (Germain, 1997; Shaw et Dustin, 1997). Ces grands complexes moléculaires à la jonction cellule T / CPA sont appelés " synapse immunitaire " (Dustin et Shaw, 1999). La synapse immunitaire s'accompagne d'une large réorganisation du cytosquelette et semble requise pour induire une activation des cellules T complète. Un co-engagement de CD3 et de la molécule de co-stimulation CD28 permettrait une réorganisation importante des microdomaines glycosphingolipidiques au site d'engagement du récepteur T appelé RAFTs (Viola *et al.*,1999). Brièvement, les microdomaines glycosphingolipidiques ou RAFTs (radeaux lipidiques) sont des complexes macromoléculaires enrichis en glycosphingolipides, en cholestérol et en protéines ancrées par un groupement GPI (« glycosyl phosphatidyl inositol »). Ce sont des domaines de petite taille soit moins de 70 nm de diamètre (Friedrichson et Kurzchalia, 1998 ; Varma et Mayor, 1998). La purification des radeaux lipidiques repose essentiellement sur leur insolubilité dans certains détergents non ioniques à 4°C (Brown et London, 1998).

### 1.6.2. Les superantigènes

La reconnaissance d'un antigène par une cellule T n'implique pas toujours la présentation d'un peptide antigénique présent dans le sillon d'une

molécule de CMH. En effet, certaines protéines ont des propriétés de fixation sur les molécules de CMH et du TCR. Ces protéines sont appelées superantigènes et sont capables d'activer un grand nombre de lymphocytes T différents. Les superantigènes sont produits par de nombreux micro-organismes. Ils se fixent directement sur la molécule de CMH sans avoir subi d'apprêtement préalable et interagissent d'une part avec la face externe et le sillon de la molécule de CMH et d'autre part directement avec la région V $\beta$  du récepteur T. L'activation par le superantigène entraîne une production et une libération massive de cytokines inflammatoires (IL-2, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) tant par le lymphocyte T auxiliaire que par la CPA. Chaque superantigène peut interagir avec un ou plusieurs V $\beta$  différents stimulant jusqu'à 20% de tous les lymphocytes T. Ce mode de stimulation n'induit pas une réponse adaptative spécifique du pathogène. Au contraire, cette stimulation conduit à la production massive de cytokine par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> responsables de deux effets majeurs : une toxicité systémique et la suppression de la réponse immunitaire adaptative par déletion de l'ensemble des cellules T porteuses du V $\beta$  activé par le superantigène. Ces deux effets contribuent largement au pouvoir pathogène du micro-organisme. Au cours de cette étude nous avons utilisé un superantigène bactérien, *Staphylococcal Enterotoxin A* (SEA), afin d'observer le comportement d'une lignée cellulaire représentative des lymphocytes B lors de la réponse immunitaire. Le SEA est une protéine de 25.81kDa et possède 220 acides aminés (Johnson *et al.*, 1986).

### 1.6.3. La famille Src

Il sera brièvement décrit ici quelques protéines impliquées dans les cascades intracellulaires activées lors de l'interaction TCR-CMH-II. Par analogie, et puisque les signaux intracellulaires suite à l'interaction TCR-CMH-II chez les CPAs sont inconnus, la localisation de CD86 (B7-2) sur les CPAs

suite à l'activation via le CMH-II pourra permettre d'hypothétiser un rôle fonctionnel de cette dernière dans l'activation des CPAs.

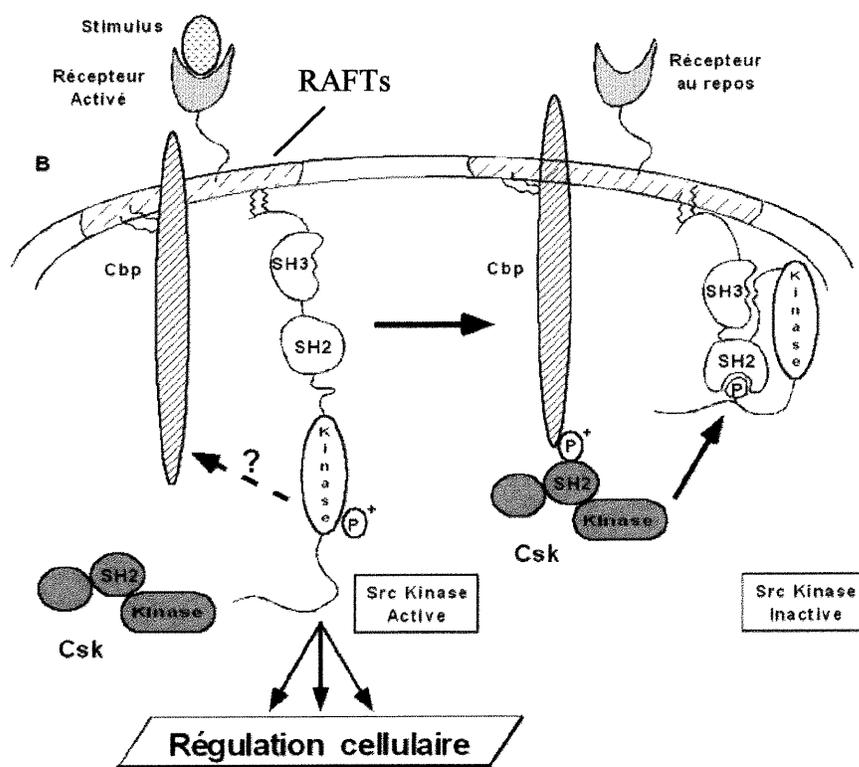
Le premier changement biochimique observé consécutivement à l'engagement du TCR est l'activation des tyrosines kinases de la famille Src (Samelson *et al.*, 1986 ; June *et al.*, 1990), principalement Lck (Straus et Weiss, 1992) et Fyn (Samelson *et al.*, 1990). Cette famille regroupe une dizaine de tyrosines kinases dont Src elle-même, Fyn, Lck ou encore Lyn. Elles présentent une structure commune constituée de six domaines distincts : un domaine SH4, une région unique, un domaine SH3 suivi d'un domaine SH2, un domaine catalytique et un domaine régulateur.

Le domaine SH4 est situé dans la partie N-terminale de la kinase. Il va être le lieu de modifications impliquant l'addition de lipides qui vont permettre la localisation membranaire de la protéine, élément primordial pour l'activité de ces enzymes. Cet ancrage membranaire se fera grâce à la palmitoylation de résidus Cys (cystéine) (3, 5 et/ou 6) et/ou à la myristylation d'un résidu Gly (glycine) du SH4. Il semble que la palmitoylation soit un événement post-traductionnel alors que la myristylation est une modification co-traductionnelle (Rudd *et al.*, 1991). Les régions SH2 et SH3 sont des domaines d'interactions protéines-protéines. SH3 interagit avec des régions riches en prolines alors que le SH2 va lier des tyrosines phosphorylées. Le domaine catalytique comporte une lysine essentielle pour la liaison de l'ATP. Les membres de la famille Src contiennent notamment deux résidus de tyrosine impliqués dans l'activité kinase (Xu *et al.*, 1999) qui conduit à une augmentation de l'activité probablement suite à un changement de conformation de la protéine. La Tyr527 (pour Src) est situé dans le domaine régulateur de la kinase. Sa phosphorylation aboutit à une diminution de l'activité (Brown et Cooper, 1996).

Plusieurs autres protéines kinases sont aussi impliquées dans les mécanismes d'induction des cascades intracellulaires menant à l'activation efficace des lymphocytes T ; tels les Csk (*Carboxy-terminal Src kinase*) et la Cbp (*Csk-binding protein*) (Xu *et al.*, 1999). La figure 5 représente le mécanisme d'activation de la Csk.

**FIGURE 5 : Mécanisme d'activation et d'inactivation des membres de la famille Src.**

La transduction des signaux s'effectue suite à la stimulation du récepteur, les SFKs (« Src Family of tyrosine kinase ») sont activées et vont phosphoryler différents substrats dont éventuellement Cbp. Suite à cette phosphorylation sur la tyrosine, Csk peut se lier à Cbp par son domaine SH2.



#### 1.6.4 Protéine tyrosine phosphatase (CD45) et Protéines tyrosine kinase (Zap-70).

L'activité des Src peut être aussi régulée par des tyrosines phosphatases tel que CD45. CD45 est une molécule transmembranaire de 201kDa présente en abondance chez tous les leukocytes. Elle possède, dans sa partie cytoplasmique, deux domaines PTP (« Protein Tyrosine Phosphatase »). CD45 régule l'activité des Src via une déphosphorylation des domaines intracellulaires. Cette déphosphorylation mènera à une inhibition de l'action de d'autres Src, soit la p56Lck et p59Fyn (Ashwell et D'Oro, 1999). CD45 joue donc un rôle central dans l'état d'activation des lymphocytes. CD45 est exclus des RAFTs, permettant ainsi à son activité de s'effectuer de manière efficace. En quiescence, CD45 déphosphoryle les Src sur leurs deux sites les rendant inactives. Suite à l'activation du TCR, les protéines membranaires se re-localisent, les protéines kinases s'associent aux complexes formés par le TCR suite à une mobilisation des RAFTs d'où est exclus CD45. Il en résulte une inhibition de la déphosphorylation des ITAM menant à l'activation lymphocytaire. L'activité phosphatase du CD45 s'exerce aussi à l'égard des protéines tyrosines kinases p56Lck et p59Fyn. CD45 déphosphoryle préférentiellement ces protéines sur leur tyrosine C-terminale inhibitrice et participe donc activement à l'activation lymphocytaire.

Les cellules T expriment principalement deux membres de la famille Src : p56Lck et p59Fyn (Olszowy *et al.*, 1995 ; Cooke et Perlmutter, 1989) qui interagissent avec le TCR (Samelson *et al.*, 1990 ; Timson Gauen *et al.*, 1992; Duplay *et al.*, 1994 ; Straus *et al.*, 1996). La fixation du co-récepteur CD4 et CD8 sur les régions conservées du CMH amène à proximité du TCR la protéine tyrosine kinase p56Lck activée. Cette dernière phosphoryle les ITAM des chaînes intracytoplasmiques du CD3 et conduit au recrutement d'une protéine cytoplasmique à activité tyrosine kinase : Zap-70. Zap-70 est une protéine de la

famille Syk (protéines tyrosines kinases), elle possède deux domaines SH2 spécifiques des ITAM phosphorylés et un domaine catalytique C-terminal. Zap-70 se fixe sur les ITAM phosphorylés du CD3 $\zeta$  permettant à p56Lck de phosphoryler le domaine catalytique de Zap-70 et d'activer cette dernière (Cantrell, 1996 ; Acuto et Cantrell, 2000 ; Wange et Samelson, 1996 ; Van Leeuwen et Samelson, 1999). Suite à la phosphorylation des ITAM, Zap-70 va alors pouvoir phosphoryler un substrat jouant un rôle central : la protéine LAT (Martelli *et al.*, 2000). LAT va permettre l'interaction, entre autres, avec Grb-2, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3 kinase) et la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ).

### 1.7 Signaux d'activation des lymphocytes B

Les cellules B matures suite à leur production par la moelle osseuse, entrent dans un état quiescent et le demeurent jusqu'à ce qu'elles rencontrent un antigène. Le contact entre l'antigène et les Ig membranaire se traduit par une augmentation de l'expression membranaire des molécules de classe II du CMH, l'entrée en cycle cellulaire des cellules et dans le cas d'une stimulation antigénique forte par leur prolifération (Abbas *et al.*, 1997). Les lymphocytes B ne sont pas seulement des cellules effectrices capables de synthétiser des immunoglobulines, ils peuvent également apprêter et présenter des antigènes aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques. Le complexe CMH-peptide est alors reconnu par les lymphocytes T spécifiques. Ce type d'interaction entre le lymphocyte B et le lymphocyte T n'est pas unique. Le lymphocyte T exprime à sa surface des molécules capables d'interagir avec des protéines membranaires présentes sur le lymphocyte B tout comme les lymphocytes CD4 et CD8. L'identification de CD40 Ligand exprimé sur les cellules T activées a permis de mieux discerner le rôle des différentes molécules membranaires présentes sur le lymphocyte T et capables d'activer le lymphocyte B.

CD40 est une glycoprotéine appartenant à la famille du TNF. Elle est exprimée de façon constitutive sur les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques. CD40 Ligand est une glycoprotéine membranaire de 33 kDa appartenant à la superfamille du TNF. Elle est exprimée sur les lymphocytes T auxiliaires activés rapidement après activation (2 à 3 heures), puis régulée de façon négative de 24 à 48 heures après stimulation. L'activation de CD40 par CD40 Ligand contrôle de nombreuses étapes de l'activation lymphocytaire B. L'activation de CD40 sur le lymphocyte B conduit à la transduction d'une cascade de signaux activateurs caractérisée par la phosphorylation de tyrosine, par l'action de p59Fyn et de la PLC $\gamma$ 2 (section 1.6.3). L'activation via CD40 induit l'expression des molécules de co-stimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) sur le lymphocyte B. Enfin, l'interaction CD40/CD40 Ligand permet l'induction et la maintenance de la mémoire immunitaire (Abbas *et al.*, 1997).

La présentation de l'antigène par les lymphocytes B favorise la différenciation des lymphocytes T spécifiques en lymphocyte Th2. L'interaction entre CD40 présent sur le lymphocyte B et CD40 Ligand présent sur la cellule T ne peut à elle seule expliquer cette différenciation préférentielle. En effet, les macrophages expriment eux aussi CD40 alors qu'ils favorisent la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype Th1. Ainsi, d'autres molécules membranaires ont été évoquées comme facteurs favorisant la différenciation Th2 lorsque l'antigène est présenté par les lymphocytes B. Les molécules candidates incluent d'autres membres de la famille de CD40 comme CD70 et OX40L. Une expression différentielle des molécules de co-stimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) pourrait aussi être à l'origine de cette dichotomie.

## **2. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE**

Comme mentionné ci-haut, l'activation des cellules T naïves nécessite la reconnaissance d'un fragment peptidique étranger fixé sur une molécule du CMH autologue. Si cet événement de reconnaissance est nécessaire, il ne peut à lui seul permettre l'activation du lymphocyte T. L'activation du lymphocyte T requiert la présence de signaux de co-stimulation délivrés à la cellule T par les cellules présentatrices de l'antigène. Seules les CPAs expriment à leur surface à la fois le complexe CMH-peptide et les molécules de co-stimulation nécessaires à l'expansion clonale des lymphocytes T naïfs et leur différenciation en cellules effectrices activées.

La réponse immunitaire adaptative n'est pas amorcée au site d'entrée du pathogène dans l'organisme. Elle se développe dans les organes lymphoïdes périphériques dans lesquels le micro-organisme ou ses produits sont transportés via le réseau lymphatique. Les pathogènes qui pénètrent dans l'organisme par voie sanguine (ou au cours d'une septicémie) sont piégés dans la rate alors que ceux dont la porte d'entrée est cutanée ou muqueuse s'accumulent dans les ganglions, les plaques de Peyer ou les amygdales. Ces organes lymphoïdes secondaires contiennent des CPAs spécialisées dans la capture des antigènes et l'activation des lymphocytes T. Certaines cellules comme les cellules de Langerhans (cellules dendritiques de la peau) sont capables de capter localement l'antigène et de le transporter dans les organes lymphoïdes secondaires.

De manière générale, une cellule T naïve pénètre dans un ganglion en traversant des vaisseaux spécialisés connus sous le nom de *high endothelial venule* (HEV). Les cellules T naïves qui rencontrent l'antigène présent à la surface d'une CPA arrêtent leur migration, prolifèrent et se différencient en cellules effectrices activées.

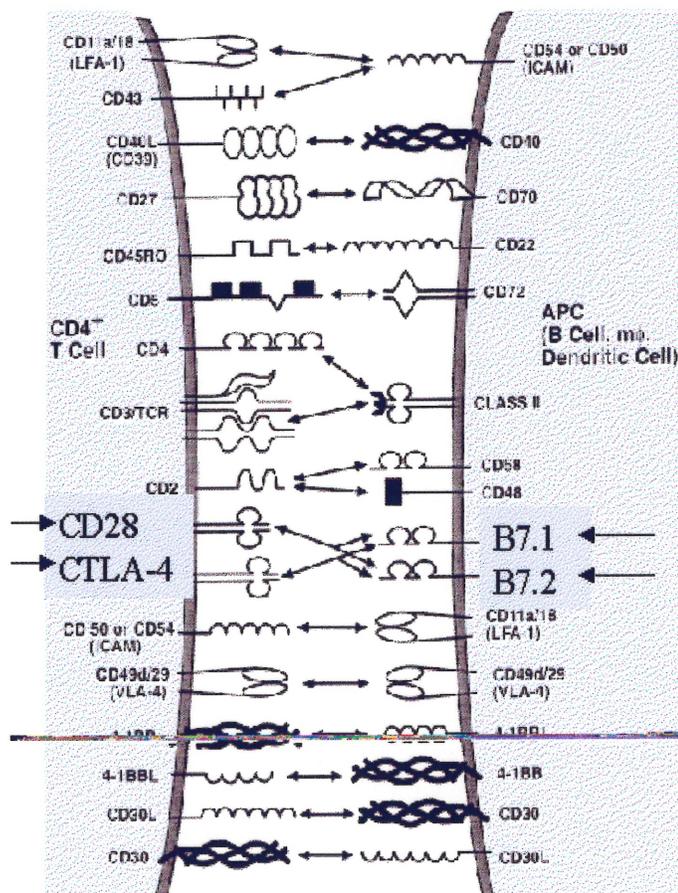
Les trois principales CPAs présentes dans les organes lymphoïdes périphériques sont les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Chacune de ces cellules est spécialisée pour apprêter et présenter l'antigène aux lymphocytes T spécifiques. Les cellules dendritiques fonctionnent exclusivement comme CPA, alors que les macrophages et les lymphocytes B exercent aussi d'autres fonctions au cours de la réponse immunitaire. Ces trois types cellulaires expriment les molécules de co-stimulation (CD80/CD86) indispensables à l'activation des cellules T naïves. Toutefois, les cellules dendritiques sont les seules à exprimer constitutivement ces molécules de co-stimulation qui ne seront induites sur les macrophages et les cellules B qu'après leur contact avec le micro-organisme pathogène.

### **3. LES MOLÉCULES DE CO-STIMULATION CD80 et CD86**

Les molécules de co-stimulation les mieux caractérisées sont les molécules B-7 (CD80 ou B7-1 et CD86 ou B7-2). Ces molécules ont une structure homodimérique et elles appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Henry *et al.*, 1999). Elles possèdent des régions constantes ( $C_L$ ) et des régions variables ( $V_L$ ) de la superfamille des Ig (Freeman *et al.*, 1989, 1993 ; Azuma *et al.*, 1993). CD80 et CD86 sont exprimés exclusivement à la surface des CPAs (Figure 6). De plus, les molécules B7 interagissent avec deux types de récepteurs présents à la surface des lymphocytes T : CD28 et CTLA-4 (Henry *et al.*, 1999 ; Ikemizu *et al.*, 2000). CD28 et CTLA-4 se lient à CD80 et CD86 via le motif MYPPPY au niveau du domaine de l'immunoglobuline (Chambers et Allison, 1999). CTLA-4 et CD28 sont structurellement similaires et sont exprimés à la surface des cellules comme des homodimères avec un domaine simple  $V_L$  (Aruffo et Seed, 1987 ; Brunet *et al.*, 1987) (voir figure 7 pour une description plus approfondie des structures de CD80 et CD86 ainsi que de leurs ligands CD28 et CTLA-4).

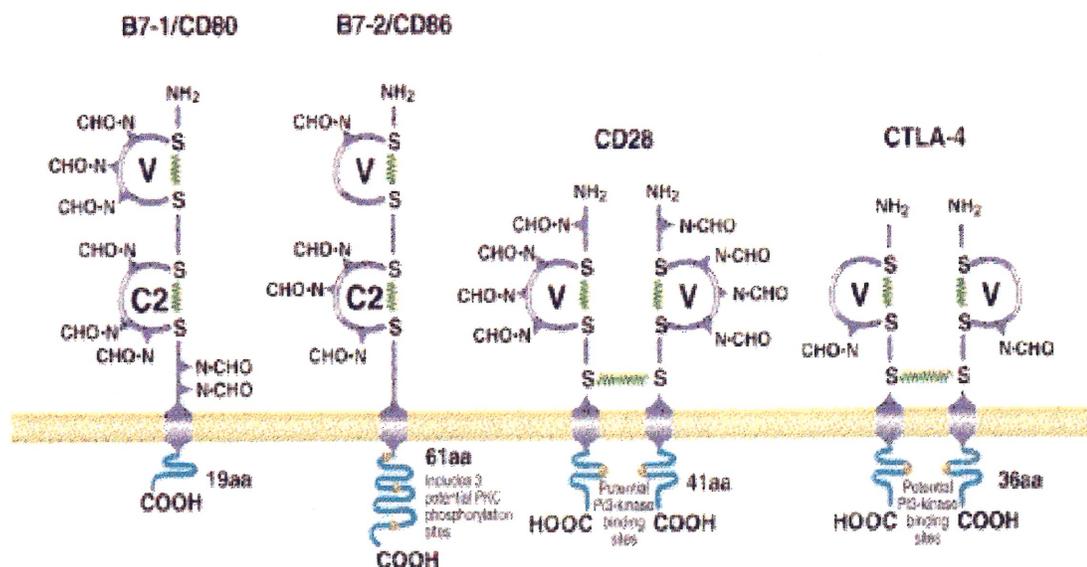
**FIGURE 6 : Schéma d'une synapse immunologique.**

La synapse immunologique est la jonction spécialisée entre le lymphocyte T et la CPA. Plusieurs molécules sont impliquées dans cette jonction tel que : ICAM/LFA-1,2,3/CD2/CD58 qui sont des molécules d'adhésions qui permettent le premier contact entre les cellules T et les CPA ; CD40/CD40 Ligand (CD40 est exprimé constitutivement sur les CPA et amène une régulation positive de CD80 et CD86) ; CD28/CTLA-4 ainsi que CD80 (B7-1)/CD86 (B7-2) qui sont des molécules de co-stimulation.



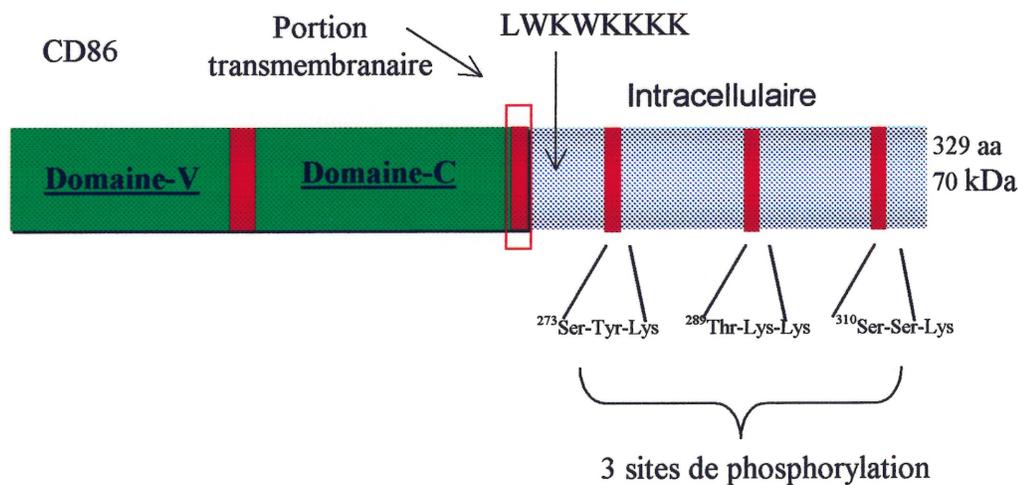
**FIGURE 7 a: Représentation schématique de la structure de CD80 (B7-1)/CD86 (B7-2) et de CD28/CTLA-4.**

Les molécules de co-stimulation possèdent des domaines variable et constant comme les immunoglobulines ainsi que des ponts disulfures. De plus, il est possible de noter la présence d'une longue queue intracellulaire chez CD86 (62 acides aminés) comparativement à CD80 (19 acides aminés) qui comportent trois sites de phosphorylation reconnus par la PKC (SYK, TKK, SSK).



**FIGURE 7 b : Structure de CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2).**

Les trois sites de phosphorylation (SYK, TKK, SSK) reconnue par la PKC suggèrent un rôle possible dans l'activation des CPAs. De plus, comme CD86 a un site de reconnaissance pour la *GTP Binding Protein Binding site* (LWKWKKKK), ceci permet à CD86 de s'agréger au niveau des RAFTs et faciliterait par conséquent la signalisation intracellulaire de CMH-II. De plus, le poids moléculaire de CD86 est de 70 kDa (329 acides aminés) alors que CD80 a un poids moléculaire de 55 kDa (288 acides aminés). La liaison de CD28 avec CD86 amène une activation des kinases et des phosphatases à la synapse immunologique et les cascades intracellulaires qui découlent de l'activation des cellules T.



CD80



### 3.1 Rôle des molécules de co-stimulation dans l'induction d'une réponse immune T dépendante.

Les cellules T sont activées lorsque le complexe TCR/co-récepteur CD4 ou CD8 reconnaît un complexe CMH-I ou CMH-II-peptide respectivement à la surface d'une CPA. Toutefois, cette interaction ne peut à elle seule stimuler la prolifération des cellules T naïves et leur différenciation en cellules effectrices. L'expansion clonale des cellules T spécifiques de l'antigène nécessite un deuxième signal qui doit être délivré à la cellule T par la même cellule que celle qui présente l'antigène. Ce phénomène est défini comme étant le modèle à deux signaux.

La liaison B7/CD28 stimule la prolifération et la différenciation des cellules T via la phosphorylation de la sous-unité  $\zeta$  du TCR (section 1.6). Après leur activation (24 à 48 heures) les cellules T expriment le second récepteur des molécules B7, c'est à dire CTLA-4 (Greenfield *et al.*, 1998 ; Mondino et Jenkins, 1994). CTLA-4 a une forte homologie de séquence avec CD28 et les deux molécules sont codées par des gènes voisins sur le génome. CTLA-4 se lie sur les molécules B7 avec une affinité 7 à 14 fois supérieure à celle de CD28 et induit un signal inhibiteur aux lymphocytes T activés. De plus, CD28 se dissocie plus rapidement d'avec CD80 (B7-1) comparativement à CD86 (B7-2) (McLellan *et al.*, 1995 ; Agadjanjan *et al.*, communication personnelle). Donc, CTLA-4 se lie plus fortement à CD80 et CD86 comparativement à CD28, avec une cinétique de liaison plus favorable à CD80 comparativement à CD86. Ces résultats semblent donc suggérer que CD86 soit plus important dans l'initiation de la réponse immunitaire que CD80, puisque CD80 est exprimé plus tardivement et intervient négativement dans l'amplification ou la régulation de la réponse immunitaire (Borriello *et al.*, 1997). De fait, CTLA-4 joue un rôle primordial dans le contrôle de la réponse immunitaire en limitant une expansion trop importante des lymphocytes T

activés par l'antigène et en permettant l'arrêt de la réponse immunitaire (Ostrov *et al.*, 2000 ; Salomon *et al.*, 2000 ; Kuhns *et al.*, 2000 ; Schwartz *et al.*, 2001 ; Stamper *et al.*, 2001).

Ce rôle de CTLA-4 a été confirmé chez des souris *knockout* CTLA-4<sup>-/-</sup>. Ces souris présentent en effet un syndrome lymphoprolifératif massif létal (Tivol *et al.*, 1995). CTLA-4 inhibe le signal de transduction provenant du TCR en recrutant une tyrosine phosphatase (SHP-2) au TCR. Ce phénomène résulte en une déphosphorylation de la chaîne  $\zeta$  du complexe et certaines composantes des voies de signalisation associées à Ras (Ikemizu *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 1998).

CD28 est exprimé sur la majorité des lymphocytes et permet une activation des cellules T et une prolifération de ces dernières suite à son association avec CD80 (B7-1) et/ou CD86 (B7-2) (Murphy *et al.*, 1994 ; Doty et Clark, 1996 ; Doty et Clark, 1998). Bien que de nombreuses molécules aient été impliquées dans les phénomènes de co-stimulation, jusqu'à présent, seuls CD80 et CD86 induisent via CD28 les signaux nécessaires à l'induction d'une réponse immunitaire efficace.

#### **4. SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE**

Un des événements principaux dans le développement de l'immunité est l'activation des cellules T. Au centre de ce processus se retrouve le TCR qui déclenche l'activation par une interaction spécifique avec l'antigène présenté par le CMH des CPAs.

Cette jonction spécialisée entre le lymphocyte T et la CPA consiste en un amalgame de TCR entouré de molécules d'adhésions (Garkoui *et al.*, 1999). Cette synapse immunologique se produit en trois étapes ; la formation de la

jonction, le transport du CMH-peptide et finalement la stabilisation du complexe.

Pour qu'une réponse immune soit initiée, il faut que les lymphocytes T ou B, après reconnaissance de leur antigène spécifique, subissent une activation de divers programmes cellulaires (prolifération, synthèse et sécrétion de cytokines, expression de récepteurs membranaires permettant les échanges de messages et la migration vers des lieux appropriés, excrétion de médiateurs préformés, différenciation).

Avec leur immense répertoire de reconnaissance, les lymphocytes T ou B n'ont aucune possibilité, via leurs récepteurs, de faire le tri entre les antigènes sans danger, comme ceux du soi, et ceux présentant un risque comme les antigènes microbiens. Les lymphocytes doivent donc s'appuyer sur des informations venant d'autres récepteurs, leur intégration déterminant la réponse finale. Selon le type cellulaire impliqué et les signaux en jeu, la réponse pourra varier de la simple indifférence à une activation maximale impliquant par exemple une expansion clonale proliférative et la sécrétion de multiples cytokines jusqu'à l'induction d'un état de tolérance ou de mort cellulaire par apoptose.

Il est connu depuis de nombreuses années que l'application d'anticorps dirigés contre des molécules de surface des lymphocytes impliquées dans leur signalisation (Ig, TCR, CD3, CD2, CD28) induit le regroupement en "caps" en quelques minutes, phénomène actif requérant des microfilaments d'actine intacts. En 1998, il a été observé que l'interaction entre un lymphocyte T et une CPA aboutit à un phénomène semblable de regroupement de certains récepteurs, dénommés SMACs (« Supra Molecular Activation Complexes ») pour former une véritable synapse immunologique T/CPA stable pendant plusieurs heures (Wülfing *et al.*, 2002). Comme le capping, la formation des SMACs nécessite la polymérisation de l'actine. La formation d'une synapse

stable paraît indispensable lorsque quelques dizaines de complexes peptides du CMH suffisent pour activer un lymphocyte T alors que l'affinité des TCR pour ces complexes est faible.

L'interaction initiale entre le lymphocyte T et la CPA est médiée par la molécule ICAM-3 très abondante à la surface des lymphocytes T, qui avec ses 5 domaines Ig permet un contact intercellulaire à grande distance avec la molécule à fonction C-lectine. Très rapidement cette adhésion initiale est complétée par la participation du couple LFA-1-ICAM-1, interagissant également à grande distance. Une fois engagée, d'autres contacts non spécifiques avec des molécules plus petites s'établissent, CD2-CD58/CD48 (voir figure 6). Sans entrer dans les détails biochimiques, rappelons que les intégrines des lymphocytes en quiescence ont très peu de capacités adhésives puisque leurs extrémités intracytoplasmiques sont immobilisées via la taline sur le réseau cortical d'actine sous membranaire, limitant leur diffusion et donc leur aptitude à établir un contact avec leur ligand.

Dans les premières minutes de l'interaction intercellulaire, la partie centrale de la zone de contact T/CPA est occupée par les couples intégrine-ICAM tandis qu'un anneau périphérique établit un contact entre TCR-CMH-peptide. Mais très rapidement une disposition inverse s'installe avec les TCR migrant vers la zone centrale entourée par un anneau d'intégrine LFA-1-ICAM-1. Ces mouvements sont dépendants d'une contraction du cytosquelette, médiée par l'effet moteur de la myosine II. Ainsi donc, le seul engagement des TCR va provoquer la mise en place d'une synapse immunologique dont l'organisation spatiale permet de vaincre les différentes barrières existant à priori entre le lymphocyte T et la CPA.

La formation de la synapse immunologique stable et l'activation de la machinerie enzymatique sous-jacente vont être facilitées par un second

mécanisme qui est celui de la coalescence de radeaux lipidiques (ou GEMs (« glycosphingolipid enriched membranes ») ou microdomaines ou radeaux lipidiques ou RAFTs). Ces derniers sont distribués de façon uniforme dans les cellules en quiescence et servent de plate-forme aux protéines à ancrage GPI (par exemple CD14, CD16b, CD58, CD59), à certaines molécules membranaires externes comme CD4 ou CD8, ou internes comme la protéine adaptatrice LAT et les tyrosines kinases de la famille Src (Lyn, Lck, Fyn). Après activation cellulaire, certaines protéines s'intègrent aux RAFTs, entre autres les récepteurs tels que BCR, TCR, Fcε R1, FcαR.

Ces interactions protéines-lipides ou lipides-lipides sont provoquées par les mouvements du cytosquelette. Elles mettent en contact des tyrosines kinases avec des cibles de phosphorylation. De plus, les RAFTs participent à l'activation lymphocytaire en excluant les activités phosphatasiques comme CD45 de la synapse et en amplifiant le mouvement des enzymes et des protéines adaptatrices via l'action de CD28 (tel que décrit précédemment).

### **5. RAFTs : radeaux lipidiques ou microdomaines distincts de la membrane plasmique**

Toutes les membranes cellulaires sont composées d'une bicouche lipidique, leurs extrémités hydrophobes apposées, regardant vers l'intérieur de la membrane, tandis que les têtes polaires sont exposées sur ses 2 versants externes. Les lipides comprennent des phospholipides (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, cardiolipide, sphingomyéline), du cholestérol et des glycolipides.

Le premier modèle de la structure de la membrane était le modèle de Davson et Danielli en 1935. Dans ce modèle de membrane, des protéines

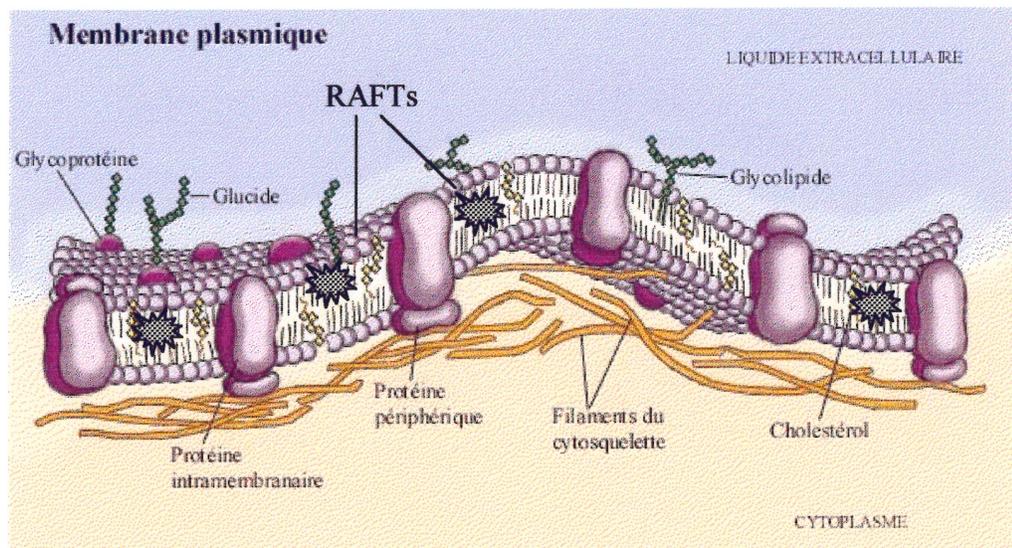
recouvraient la surface de la double couche de lipide. Ce modèle a été révisé par Singer et Nicolson (1972), qui ont montré que la membrane est faite d'une double couche fluide de phospholipides dans laquelle flottent des protéines (Figure 8). Ces membranes ne sont pas statiques car les phospholipides et les protéines peuvent bouger latéralement dans la membrane, d'où le nom de la mosaïque fluide. Le cholestérol est important dans la structure des membranes animales car il s'insère entre les molécules de lipides et a comme fonction de maintenir la fluidité de la membrane lorsqu'il y a des variations de températures (Figure 9). Le pourcentage de cholestérol dans une membrane varie parmi les différents tissus des animaux mais peut représenter entre 15 et 50% des lipides totaux de la membrane (Darnell *et al.*, 1993).

Un dernier concept datant du début des années 90 remettant en cause le modèle simple de mosaïque fluide des membranes cellulaires (1972) est celui d'une organisation préférentielle de certains constituants membranaires, limitant ainsi leur mobilité latérale. Les glycosphingomyélines et les protéines à ancrage GPI semblent former des microagrégats, riches en cholestérol, appelés radeaux lipidiques ou RAFTs. Ces derniers excluent la plupart des protéines transmembranaires et favorisent plutôt les protéines à ancrage lipidique.

La sphingomyéline est le seul phospholipide dépourvu de glycérol : un alcool gras aminé, la sphingosine, à longue chaîne aliphatique (C18) forme une liaison amide avec un acide gras, générant ainsi un céramide (Figure 9). Le groupe OH terminal de la sphingosine est estérifié par de la phosphorylcholine (la tête polaire est donc identique à de la phosphatidylcholine). La molécule de céramide intervient également dans la constitution de nombreux glycolipides, toujours situés sur la face externe des membranes (le plus simple est le glucosylcérebroside, fait d'une molécule de glucose attaché au OH terminal du céramide).

**FIGURE 8 : Structure de la membrane plasmique selon le modèle de la mosaïque fluide.**

La membrane plasmique est une double couche de lipides (phospholipides, cholestérol et glycolipides) dans laquelle sont intégrées des protéines. Les substances lipidiques possèdent des régions hydrophiles et hydrophobes. La majorité des protéines sont transmembranaires et sont responsables de la plupart des fonctions spécialisées de la membrane. Les microdomaines sont présentés ici par des formes étoilées.



La majorité des phospholipides ont des faibles chaînes acyles. Ceci explique pourquoi les membranes cellulaires existent sous forme fluide-liquide-cristalline. Par contre, certaines membranes d'eucaryotes sont riches en sphingolipides et en stérols ce qui influence grandement l'état des membranes. Les protéines constituant ces membranes peuvent être associées à des chaînes d'acyles saturées de 2 façons : soit par myristoylation ou palmitoylation (Brown et London, 1998 ; Brown et London, 2000 ; Janes *et al.*, 2000). Les RAFTs sont des microdomaines distincts de la membrane plasmique (Figure 8). Ils sont enrichis de sphingolipide, de cholestérol et de protéines membranaires spécifiques (Figure 9). De plus, ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires incluant l'endocytose, le triage au niveau de cellules polarisées et la transduction de signal (Ikonen, 2001 ; Huby *et al.*, 1999).

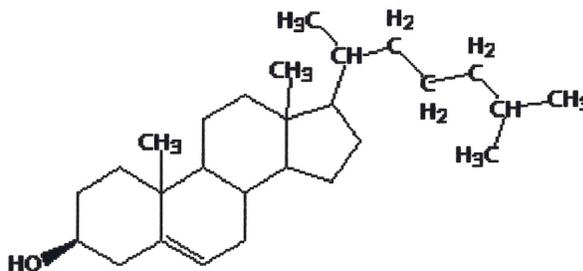
Les RAFTs sont plus abondants au niveau des membranes riches en cholestérol et sphingolipides telles que la membrane plasmique, la voie sécrétoire tardive et les compartiments endocytiques (Brown et London, 2000). De manière plus technique et de part leur constitution riche en cholestérol et en sphingolipide, il est possible d'isoler et de caractériser les RAFTs avec un marqueur spécifique soit GM1 (ganglioside) suite à une extraction sur densité de saccharose à 4°C (Brown et London, 2000 ; Hooper, 1999). En effet, les RAFTs sont insolubles aux détergents dus à l'empaquetage serré des chaînes acyles. L'interaction lipide-lipide est beaucoup plus stable que l'interaction lipide-détergent.

**FIGURE 9 : Structures d'une molécule de cholestérol et de sphingolipide formant les RAFTs.**

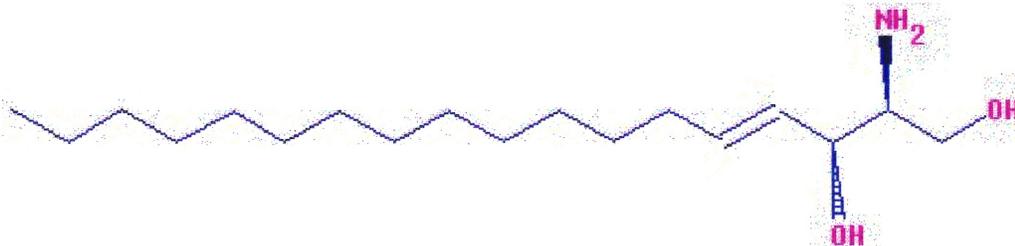
a) Le cholestérol est composé de quatre cycles condensés (A, B, C et D). Des groupes méthyles substituent C-10 et C-13, un hydrocarbure aliphatique est fixé sur C-17, une liaison double relie C-5 à C-6 et un groupe hydroxyle est présent en C-3.

b) La sphingosine est un alcool à longue chaîne, qui comprend une queue hydrocarbonée hydrophobe, un groupe amine auquel peut se fixer un acide gras, et un groupe hydroxyle en C-1, auquel peut s'attacher la tête polaire.

a.



b.



De nombreuses études indiquent que les RAFTs peuvent s'agglomérer suite au « cross-linking » et générer de large structure visible par microscopie. Cette agglomération module l'activité de signalisation lors de l'activation des cellules T et par conséquent la formation de la synapse immunologique. Ainsi, de nombreuses protéines associées à l'activation des cellules T tels que SYK, Zap-70, PTK (voir à la section 1.6) sont situées dans ces microdomaines que forment les RAFTs (Kabouridis *et al.*, 2000 ; Janes *et al.*, 1999 ; Janes *et al.*, 2000 ; Parolini *et al.*, 1999). Or, comme l'engagement de CD28 permet une redistribution de la membrane plasmique et par conséquent des RAFTs qui la compose, cette redistribution amène les kinases et les phosphatases à la synapse immunologique et permet l'activation des cellules T et des cascades intracellulaires qui en découlent. La redistribution des protéines à la surface membranaire est généralement nécessaire à la transduction des signaux extracellulaires dans la cellule. Puisqu'il a été démontré qu'au niveau des lymphocytes T les microdomaines RAFTs sont près des protéines de régulation à proximité du TCR par analogie avec CD28, il est possible d'hypothétiser que les mêmes mécanismes de régulation sont présents à la surface des CPAs.

## **6. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

Très peu de données scientifiques sont connues concernant l'activation des CPAs. Par analogie avec les connaissances de la signalisation intracellulaire, nous émettons l'hypothèse que CD86 (B7-2) se comporte de manière analogue à CD28. En effet, il a déjà été démontré que CD28 est associé aux RAFTs via une interaction avec la protéine LAT (Martin *et al.*, 2001). Il est déjà connu que la liaison de CD28 avec CD86 amène une activation des kinases et des phosphatases à la synapse immunologique menant à l'activation des cellules T. De plus, la proximité des membranes et l'activation rapide des cellules T suite à l'interaction de protéines semble suggérer que CD86 soit également localisé dans les RAFTs (par analogie avec

CD28). Or, la présence d'une longue queue intracellulaire chez CD86 (88 acides aminés), qui comportent trois sites de phosphorylation reconnus par la PKC, comparativement à CD80 (19 acides aminés), suggère un rôle possible de CD86 dans l'activation des CPAs. De plus, la queue intracellulaire de CD86 possède un site d'attachement pour la « GTP binding protein » qui permet de postuler que CD86 pourrait être localisé dans les RAFTs facilitant par conséquent la signalisation intracellulaire des CPAs.

Ceci nous amène à investiguer la distribution de CD86 (B7-2) à la membrane plasmique et à déterminer le rôle de cette protéine dans la transduction du signal intracellulaire au niveau des cellules B. Ainsi, plusieurs hypothèses seront à vérifier telles que :

- Est-ce que la protéine CD86 est localisée dans les structures insolubles au Triton (RAFTs)?
- Est-ce que les complexes protéiques des CPAs se comportent de façon analogue aux complexes protéiques des cellules T lors de la formation des synapses immunologiques?
- Y a-t-il formation de pré-complexe CMH-II/CD86 à la surface membranaire ou dans des vésicules intracellulaires avant la formation du complexe CMH-II/antigène?
- Est-ce que CD86 est complexé dans les RAFTs avec des protéines de régulation de manière analogue à CD28 sur les cellules T?

## 7. TECHNIQUES UTILISÉES

### 7.1 Cytométrie en Flux

Le cytomètre de flux (CMF) ou trieur de cellules activé par fluorescence (FACS : « Fluorescence-activated cell sorter ») est une technique de séparation cellulaire qui implique le marquage de cellules avec des anticorps spécifiques couplés à un colorant fluorescent, puis la séparation des cellules marquées des non marquées dans le FACS. Cet appareil évalue la fluorescence des cellules individuelles (Alberts *et al.* 1995).

La CMF consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou une lampe à arc. Les signaux lumineux peuvent être regroupés en deux types : la lumière diffusée et l'émission de fluorescence. La lumière diffusée (*scatter*) par les cellules éclairées par le laser renseigne sur leur morphologie et leur structure. En effet, si la diffusion de la lumière est mesurée dans l'axe du rayon incident (FSC : diffusion aux petits angles), l'intensité du signal peut être corrélée avec la taille et la viabilité cellulaire, tandis que sous un angle de 90° (SSC : diffusion aux grands angles), la mesure correspond à la structure intracellulaire (réfringence du cytoplasme, morphologie, rapport nucléo-cytoplasmique). L'utilisation de ces deux paramètres permet de distinguer, dans un sang périphérique par exemple, les plaquettes, les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires. La diffusion de la lumière et l'émission de fluorescence permet donc de discriminer plusieurs types cellulaires.

## 7.2 SDS-PAGE et Immunodétection

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) sépare les protéines selon leurs masses, en leur conférant, au départ, une charge négative proportionnelle à la masse de la chaîne polypeptidique. De plus, du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du SDS sont ajoutés au gel de polyacrylamide, dont les chaînes pontées fournissent le réseau tridimensionnel que les molécules à séparer devront traverser. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol rompt les ponts disulfures, à la fois intra- et intermoléculaires, en libérant les chaînes polypeptidiques constitutives complètement dépliées. Le SDS, détergent anionique, déroule les structures protéiques et se fixe à leurs chaînes, leur conférant ainsi une charge égale par unité de masse. Les divers fragments vont par la suite migrer au travers du gel en fonction du rapport de leur charge à leur masse. Or, puisque ce rapport est identique pour toutes les espèces chargées de SDS, leur vitesse de migration est inversement proportionnelle à la résistance rencontrée. Ainsi, les grands polypeptides migrent plus lentement et les plus petits migrent plus rapidement (Rawn, 1990 ; Plummer, 1987). Le système est composé de deux gels superposés : un gel de séparation, qui est coulé en premier, et un gel d'empilement qui est polymérisé par-dessus. Or, ce système permet une séparation beaucoup plus rapide et une résolution plus grande qu'avec un gel continu seulement (Hames, 1981). Une fois séparées, les bandes de chaque fragments apparaissent suite à une coloration par bleu de Coomassie par exemple (Rawn, 1990 ; Plummer, 1987). De plus, le choix de la concentration du gel est laissé à l'utilisateur, la concentration optimale étant celle permettant une bonne visualisation des composantes présentant un intérêt particulier. En général, des concentrations variant entre 7.5% et 15% sont utilisées.

Au niveau de l'immunodétection (Western Blot), les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide/SDS à une membrane de nitrocellulose.

Par la suite, cette membrane est retirée et les protéines sont mises en évidence en utilisant des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les protéines parmi toutes les protéines cellulaires (Watson *et al.* 1994).

### 7.3 Slot Blot

Le Slot Blot suit sensiblement les mêmes principes que l'immunodétection (Western Blot). La membrane de nitrocellulose, également utilisée pour le Slot Blot, offre les avantages d'une capacité de liaison élevée et rapide par rapport aux surfaces de plastique (Beyer, 1984). Ainsi, avec un Slot Blot, il est possible de déposer directement l'échantillon à analyser sur la membrane de nitrocellulose (Towbin et Gordon, 1984).

### 7.4 ELISA

Au cours de ces travaux, le test ELISA (« enzyme linked immunosorbent assay ») a été utilisé afin de quantifier la présence de CD86 (B7-2) dans les RAFTs. Le test ELISA ou test immuno-enzymatique constitue l'un des tests sérologiques les plus utilisés pour la détection d'anticorps ou d'antigènes. Ce test implique la fixation de différentes enzymes marqueurs aux antigènes et aux anticorps selon que le test s'applique respectivement aux anticorps ou aux antigènes (Prescott *et al.* 1995). Ainsi, ce test permet, par exemple, de déterminer le taux d'antigènes en mesurant la coloration provenant des enzymes conjuguées aux anticorps qui se sont liés spécifiquement à ce type d'antigène. En effet, dans ce test les activités immunologiques des anticorps et catalytiques des enzymes sont préservées (Révillard, 1994). Deux méthodes sont particulièrement utilisées : le test indirect et le test en double sandwich.

## 7.5 Immunofluorescence

Une des techniques les plus puissantes pour localiser une protéine à l'intérieur d'une cellule ou à la surface d'une membrane cellulaire par microscopie photonique se base sur l'utilisation du microscope à fluorescence. Deux colorants très utilisés dans ce type de microscopie sont la rhodamine qui émet une lumière rouge et la fluorescéine qui émet une lumière verte. Ces colorants ont une affinité non spécifique peu élevée pour les bio-molécules, mais il est possible de les coupler chimiquement à des anticorps purifiés reconnaissant n'importe quelle molécule. L'anticorps fluorescent va se fixer aux antigènes étudiés qui deviennent alors fluorescent quand on les irradie avec la fréquence d'excitation appropriée puis, les protéines sont détectées grâce à un microscope à fluorescence. (Darnell *et al.*, 1993).

## **8. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### 8.1 Culture cellulaire

La culture de cellules *in vitro*, que ce soit avec une culture primaire ou une lignée continue, vise à procurer aux cellules un environnement similaire aux conditions *in vivo*. La lignée des cellules Raji provient d'un patient ayant un lymphome de Burkitt alors que la lignée des cellules Jurkat provient d'une leucémie humaine. Ces cellules ont été maintenues en culture dans un milieu RPMI-1640 (2mM L-glutamine, 10 $\mu$ M 2-ME) auquel on additionnait des antibiotiques et du sérum foetal de veau (10% FCS) (Gibco™ Invitrogen ; Life Technologies, Burlington, Ontario). Les antibiotiques utilisés furent la pénicilline (100 unités/ml) et la gentamicine (20 $\mu$ g/ml) provenant également de chez Gibco™. Les cellules sont cultivées dans des flacons en polystyrène Nunclon™ (Nalge Nunc International) à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Lorsque les cellules atteignent une confluence de 70-90% elles sont centrifugées 1000 RPM, 20 minutes (Centrifugeuse Sorvall) puis lavées avec du PBS 1X (Tampon phosphate salin). Les cellules sont par la suite recueillies, séparées en deux ou trois flacons et remis en culture avec du milieu RPMI-1640 neuf. Le lendemain, les cellules sont examinées au microscope afin de suivre leur croissance. La même procédure est répétée tous les deux à trois jours.

### 8.2 Décompte cellulaire

Les cellules sont récoltées et un décompte cellulaire est effectué grâce à un hémacytomètre (Fisher Scientific Cat. No. 02 671 10). L'hémacytomètre possède deux chambres principales avec des carrés de 1mm<sup>2</sup> de surface par 0,1mm de profondeur. Ceci correspond à un volume de 0,1mm<sup>3</sup>. La viabilité cellulaire est mesurée par exclusion des cellules mortes grâce à l'ajout d'un

colorant vital comme le bleu de Trypan 0.4% (Gibco™). 60µl de bleu de Trypan est ajouté à une suspension cellulaire de 20µl. Le nombre de cellules comptées dans les 4 séries de carrés extérieurs de l'hémacytomètre correspond à la concentration multipliée par la dilution. Les cellules sont centrifugées à 1000 RPM pendant 20 minutes (Centrifugeuse Sorvall) puis resuspendues à une concentration cellulaire de 250 000 à 500 000 cellules/ml.

### 8.3 Méthodes de préservation des cellules : Congélation et Décongélation.

Les cellules peuvent être congelées dans un milieu spécial empêchant la formation de microcristaux dans les cellules. Ce milieu consiste en un mélange de 90% sérum fœtal de veau (FCS) et de 10% diméthyl-sulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich). Les cellules sont centrifugées et concentrées dans le milieu de congélation à 10 000 000 cellules/ml à 4°C. 1ml de cette suspension est placée dans des tubes de cryogénéation (Nalge Nunc International). Les cellules sont congelées dans l'azote liquide jusqu'à utilisation. La décongélation des cellules s'effectue rapidement à 37°C (bain-marie). Les cellules sont resuspendues dans un milieu sans FCS à 37°C, centrifugées immédiatement à 1000 RPM, 20 minutes puis resuspendues dans 1.5ml de milieu + 10% FCS. Suite à une incubation durant toute la nuit, les cellules sont centrifugées à nouveau, comptées et resuspendues à  $1 \times 10^6$  cellules/ml.

### 8.4 Cytométrie en Flux ou FACS

Le cytomètre de flux (CMF) ou trieur de cellules activé par fluorescence (FACS) est une technique de séparation cellulaire qui implique le marquage de cellules avec des anticorps spécifiques couplés à un colorant fluorescent, puis la séparation des cellules marquées des non marquées dans le FACS (Becton-

Dickinson FACS système™, Californie). Au cours de cette étude le marquage indirect a été utilisé afin de s'assurer de la viabilité des populations cellulaires utilisées.

#### *8.4.1 Préparation des cellules pour le FACS*

Tout d'abord, la population cellulaire est ajustée à  $2 \times 10^6$  cellules/ml, et resuspendue dans une solution de FacsWash (PBS + 2% FCS). 50µl de cette population est déposées dans des puits d'une plaque de 96 puits en forme de « V » (Gibco™) et lavées avec 100µl de FacsWash. La plaque est centrifugée à 2000 RPM pendant 3min à 4°C (2 fois 100µl de FacsWash). Suite à la dernière centrifugation le culot est resuspendu avec 50µl de FacsWash. Les anticorps (1µl, de manière générale) sont par la suite ajoutés pendant 30 minutes à 4°C à l'abris de la lumière. Les cellules sont centrifugées et lavées 3 fois avec du FacsWash et l'anticorps secondaire fluorescent (1 µl dans 50 µl de FacsWash) est ajouté si nécessaire et on répète les même étapes que pour le premier anticorps. Puis, les cellules sont resuspendues dans du FacsWash afin d'obtenir 250µl par puits et transférées dans des tubes a FACS et gardées à 4°C jusqu'à la lecture des résultats grâce au logiciel CellQuest© (Version 3.01) (Becton-Dickinson).

#### *8.5 Marquage de surface*

Afin de quantifier les mouvements des protéines CD86 (B7-2) à la surface des cellules Raji, ces dernières sont marquées à la surface. La procédure d'isolement des RAFTs nécessite l'utilisation de 100 000 000 cellules. Par analogie avec le FACS, il a été déterminé qu'une concentration de 0,01µg/ml d'anti-CD86 (Pharmingen ; Cat. No. 555658) est saturante dans les

conditions décrites ci-dessous. Les cellules Raji sont centrifugées et incubées avec 15ml de PBS + 2% FCS pendant 30 minutes. Puis, elles sont centrifugées et resuspendues à 50 000 000 cellules/ml, et l'anticorps est ajouté. La suspension cellulaire/anticorps est placée sur un agitateur à 4°C durant 30 minutes afin de permettre une adhésion maximale. Les cellules sont centrifugées à 1000 RPM à 4°C et lavées 3 fois avec du PBS + 2% FCS. Les cellules sont ensuite incubées avec un anti-immunoglobuline de souris couplé à la peroxydase de Raifort ou anti-souris-HRP (provient du stock du laboratoire) à une concentration de 1/2000 pendant 30 minutes à 4°C puis lavées 3 fois avec du PBS + 2% FCS. Finalement, un dernier lavage sera effectué avec du PBS et le surnageant est resuspendue dans le tampon de lyse (section 8.7.2).

## 8.6 Isolement des RAFTs

Les RAFTs sont des microdomaines distincts de la membrane plasmique. Ils sont enrichis de sphingolipides, de cholestérol et de protéines membranaires spécifiques. Puisqu'ils sont insolubles dans les détergents non ioniques à basse température il sera possible de les isoler sur gradient discontinu de saccharose (5%, 30% et 45%) à 4°C.

## 8.7 Activation des cellules Raji par le SEA

$1 \times 10^8$  cellules Raji/ml sont centrifugées et lavées avec du PBS 1X à 37°C.  $100 \times 10^6$  cellules sont utilisées par point de cinétique effectué par un SEA (Highly purified *Staphylococcal* Toxin ; Toxin Technology ; Cat. No. AT101 ; Sarasota, Floride) à 100ng/ml. Cette cinétique est arrêtée par l'ajout de 40ml PBS 1X à 4°C. Une centrifugation à 4°C suit et les divers culots correspondant à chacun des points de la cinétique sont resuspendus dans 1ml de

PBS 1X 4°C et transférés dans des eppendorfs de 1.5ml (Sarstedt, Allemagne). Par la suite, une centrifugation rapide est effectuée à 4°C.

### 8.8 Protocole optimisé de l'isolement des RAFTs

Le culot obtenu précédemment est resuspendue dans 1000µl de tampon de lyse (recette ci-dessous) à 4°C. Les culots sont mélangés par inversion et incubés sur glace durant 45 minutes.

Tampon de lyse : 10ml tampon MEB

100µl de Triton X-100 (polyoxyethylene(10) isooctylphenyl ether ; Sigma-Aldrich)

1 caplet d'inhibiteur de protéases (Amersham Biosciences)

Tampon MEB : 1.95g MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate ; Sigma-Aldrich)

4,38g NaCl

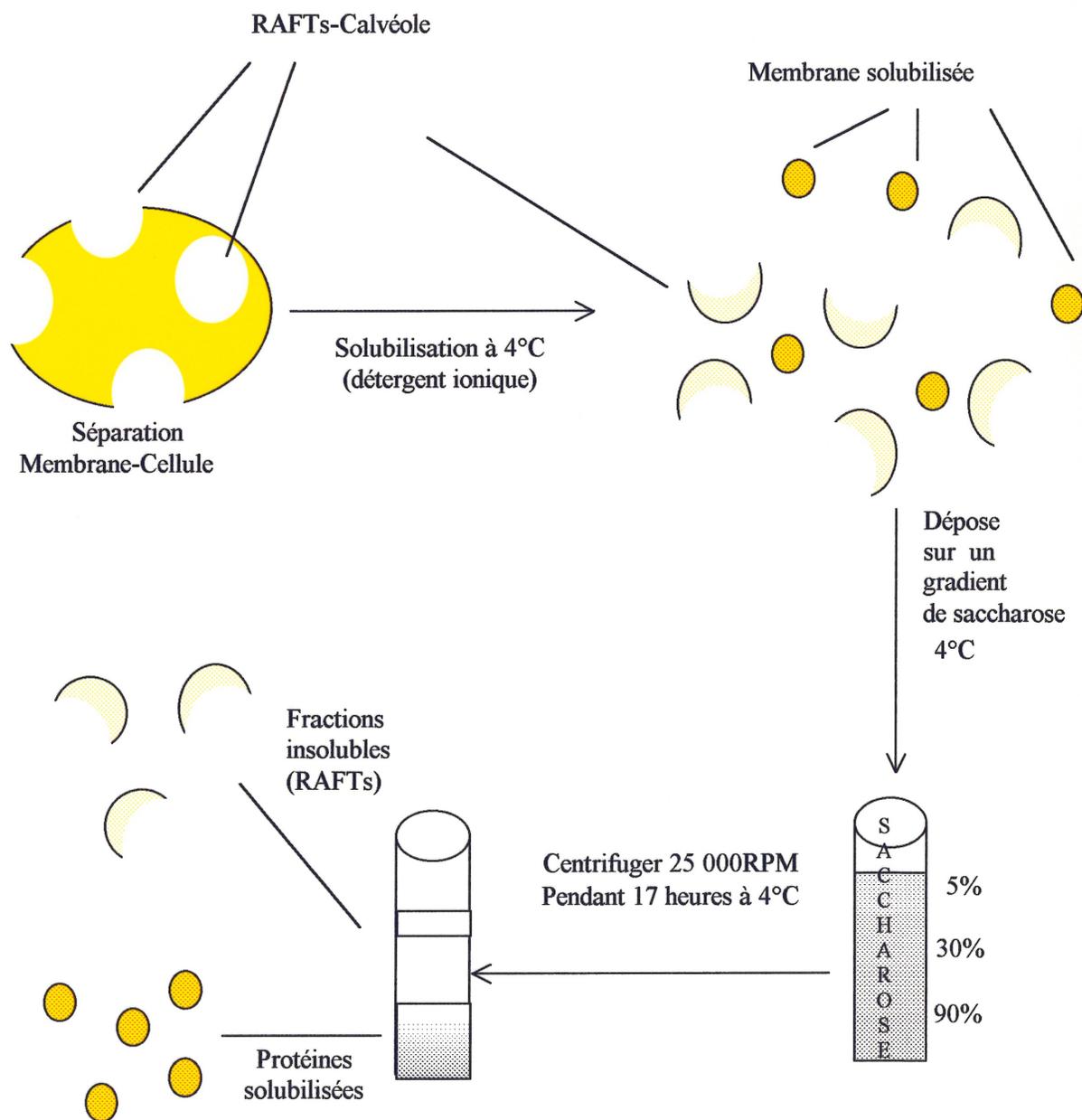
amener à 500ml avec de l'eau et ajuster le pH à 6.5

garder à 4°C

Une fois la lyse terminée, une centrifugation de quelques secondes est effectuée, le surnageant récupéré (1000µl) et déposé au fond d'un tube d'ultracentrifugation (Beckman) qui baigne dans un bain d'eau à 4°C (eau + glace dans un bécher en verre). Le lysat est ensuite dilué dans 1ml de solution 90% saccharose à 4°C (90g de saccharose dans 100ml de MEB). Cette fraction correspondra à la fraction de 45% saccharose. Puis, 5.5ml d'une solution de saccharose 30% est déposée très délicatement sur la fraction de 45%. Par la suite, on dépose 4.5ml d'une solution de 5%. Les tubes sont équilibrés avec la solution de 5% saccharose avant de les ultracentrifuger (Rotor SW41.Ti ; Beckman). Une centrifugation de 25 000 RPM (107 000 x g ) pendant 17 heures à 4°C suit. Les tubes sont par la suite retirés et placés dans la glace. Les 11ml ou 12ml du gradient sont séparés en fractions de 1ml. La fraction # 1

correspondant à la fraction supérieure (5 % saccharose) alors que la dernière fraction correspond à la fraction de 45 % saccharose. Les fractions de 1 ml sont séparées en deux fractions de 500 $\mu$ l chacune. La première est gardée à -20°C pour utilisation ultérieure alors qu'on rajoute 5 $\mu$ l de 6mM de N-Octyl glucoside (Sigma-Aldrich ; Cat. No. 09882) à la seconde. Ces dernières fractions sont incubées pour une période de 30 minutes à températures de la pièce permettant la solubilisation des RAFTs. Ces fractions peuvent être gardées à 4°C pour une utilisation ultérieure. Toutes ces étapes peuvent être visualisées au niveau de la figure 10.

**FIGURE 10 : Isolement des Rafts par un détergent non ionique suivie d'une centrifugation par gradient de densité sur saccharose. (Adapté de Hooper, 1999).**



## 8.9 Slot Blot

Le Slot Blot est un immunoessai enzymatique sur phase solide. Chacune des fractions récoltées lors de l'isolement des RAFTs est diluées dans du PBS 1X (1µl dans 1000µl) puis transférée sur membrane PVDF, (Hydrophobic polyvinylidene difluoride ; Amersham Biosciences), préalablement activée au méthanol, à l'aide d'un Slot-Blotter (Minifold® 72-Well Slot-Blot Manifold, The Better™ Blot). Les échantillons sont aspirés sur la membrane à raison de 100µl par puits. La membrane est bloquée avec une solution de PBS 5% lait pendant 30 à 45 minutes à température de la pièce. Par la suite, la membrane est incubée 30 minutes avec cholératoxine-HRP (Sigma-Aldrich ; Cat. No. C-4672) à 1/10 000 (concentration finale 0.1µg/ml) dilué dans une solution de PBS/Tween-20 0.1% (Sigma-Aldrich )/ lait 1%.

Il faut ici mentionner qu'en plus d'avoir utilisé la cholératoxine, nous avons également utilisé un anti-CD86 en parallèle pour le Slot Blot. La membrane est incubée avec l'anti-CD86 pendant 60 minutes (ID Labs biotechnology ; Cat. No. IDAC1250 ; London, Ontario) à 1/250 (concentration finale de 0.4 µg/ml) dilué avec une solution PBS/Tween-20 0.1% (Sigma-Aldrich )/ lait 1%. Les membranes sont lavées 3 fois pendant 10 minutes avec PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Par la suite, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (tous les anticorps secondaires provenaient des stocks du laboratoire) 30 minutes à température de la pièce dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Suite à l'anticorps secondaire ou la cholératoxine-HRP, les membranes sont lavées 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Finalement, le signal est développé avec chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences), selon les recommandations du fabricant.

## 8.10 SDS-PAGE

Suite au Slot Blot un SDS-PAGE sera utilisé afin de séparer les complexes protéiques. Des gels de 10% sont utilisés dans des appareils BioRad. 20µl de chacune des fractions isolées précédemment est prélevé et 10µl de tampon réducteur 2X y sont ajoutés (Tris-HCl pH 6.8 0.0625M, glycérol 10%, SDS 2%, 2β-mercaptoéthanol 5% et bleu de bromophénol 0.001%). Les échantillons sont ensuite bouillis 4 minutes afin de dénaturer les protéines. Après ébullition, 20µl de chacun des échantillons est déposé dans un puits du gel. Un standard de poids moléculaires (Benchmark™ Pre-Stained Protein Ladder ; 172.6, 111.4, 79.6, 61.3, 49.0, 36.9, 24.7 kDa ; Cat. No. 10748-010 ; GibcoBRL) est utilisé comme référence. Les protéines sont séparées durant 90 minutes à 100V ou jusqu'à ce que le standard de poids moléculaire correspondant à environ 80 kDa soit au centre du gel afin de permettre une meilleure résolution de la protéine CD86. Le tampon de migration utilisé se composait de Tris 0.025M, glycine 0.192M et SDS 0.1% pH 8.3 (Sigma-Aldrich).

## 8.11 Transfert sur membrane PVDF

La méthodologie utilisée pour le transfert des protéines est la méthode discutée par Maniatis *et coll.* (Maniatis, T., Fritsch, E.R., et Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Laboratory Press). En bref, trois morceaux de papier Whattman 3MM sont trempés dans un tampon de transfert (Tris 0.025M et glycine 0.192M ; Sigma-Aldrich) et déposés sur une éponge. La membrane PVDF est activée dans du méthanol et ensuite trempé dans du tampon de transfert. Cette dernière est déposée sur les premiers papiers Whattman 3MM. Le gel de protéines est déposé sur la membrane de nitrocellulose. Par la suite, trois morceaux de papier Whattman 3MM trempés dans le tampon de transfert sont déposés sur le gel. Puis, une deuxième éponge

est placée sur le papier Whattman 3MM. Le transfert se fera à 100V pendant 1 heure avec réfrigération soit une cuve contenant de la glace qui sera changée après 30 minutes.

## 8.12 Immunobuvardage

Suite au transfert il est possible de vérifier la présence des protéines d'intérêt grâce à des anticorps spécifiques. Les anticorps utilisés au cours de cette étude sont les suivants :

Anti-CD86 1/100 (ID Labs biotechnology ; Cat. No. IDAC 1250 ; concentration finale 0.4 µg/ml) avec un anticorps anti-souris-HRP 1/2000

Anti-actine 1/2000 avec un anticorps chèvre anti-lapin-HRP 1/2500 (provenant tous deux des stocks du laboratoire)

Anti-CMH-II (provenant du laboratoire ; lapin immunisé avec des fragments de chèvre  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH-II ainsi que des fragments d'actines humaines ;  $\alpha$  1/1000 et  $\beta$  1/500) avec un anticorps chèvre anti-lapin-HRP 1/2500

Anti-CD40 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. Sc-13128 ; concentration finale 0.2µg/ml) avec un anticorps anti-souris-HRP 1/2000

Anti-CD45 1/1000 (Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. Sc-19615 ; concentration finale 0.2µg/ml) avec un anticorps anti-souris-HRP 1/2000

La méthodologie utilisée est la même que pour celle décrite dans la section Slot Blot (section 8.9).

### 8.13 ELISA

Le test ELISA pour la quantification des protéines de surface est fait en utilisant les solutions A et B du kit de Pharmingen pour l'ELISA de l'IL-2 (Cat. No. 559104). Les 2 solutions, en volume équivalent sont mélangées puis ajoutées aux échantillons dilués dans du PBS stérile. La réaction enzymatique médiée par l'anti-souris-HRP génère le signal. Une courbe standard utilisant le même stock d'anti-souris-HRP en dilution en série est utilisée (1/1000, 1/10 000, 1/100 000, 1/400 000, 1/80 000, 1/16 000 000, 1/320 000 000, 1/640 000 000).

### 8.14 Immunofluorescence

Deux fluorochromes sont utilisés dans cette étude, le FITC (fluorescéine isothiocyanate) (excitation à 495nm et émission à 520nm) et le PE (phycoérythrine) (excitation à 488nm et émission à 575nm).

De manière générale, 80µl de cellules sont déposées (10 000 cellules) sur une région définie par un PAPPEN sur des lames de polylysine (Fisher Scientific). Les cellules par gravité se déposent pour une période de 15 minutes. Le surnageant cellulaire est aspiré et les cellules sont séchées 1 heure à l'abris de la poussière. Les cellules sont par la suite fixées 30 minutes dans une solution de formaldéhyde 4% (Sigma-Aldrich). Les plaques sont lavées six fois avec une solution de PBS 1X 5 minutes chaque fois. Les cellules sont marquées avec l'anticorps désiré pendant 30 minutes à la noirceur. L'anticorps est lavé avec 3 lavages de 10 minutes dans PBS 1X. Lorsque deux anticorps sont nécessaire, les étapes sont répétées pour le deuxième anticorps. Lorsque les marquages sont terminés, une goutte (20µl) de solution de DACO (Sigma-Aldrich) est ajoutée et une lamelle est placée par-dessus. Les lames sont conservées à 4°C dans le noir jusqu'à observation au microscope.

L'optimisation de l'immunofluorescence a été effectuée dans le laboratoire du Dr Éric Cohen sur un microscope à fluorescence à un grossissement de 20X à 40X. Pour les études proprement dites un microscope confocal a été utilisé (microscope Leica DM1RBE ; Heidelberg, Allemagne) grâce au logiciel Leica (Leica confocal software version 2.00).

Les anticorps utilisés lors de cette étude étaient :

Cholératoxine-FITC à une concentration de 1 : 250 (Sigma Aldrich ; Cat. No. 1655)

Anti-CD86-PE à une concentration de 1 : 100 (BD Biosciences ; Cat. No. 555665)

Anti-CMH-II-FITC à une concentration de 1 : 100 (BD Biosciences ; Cat. No. 555560)

IgG2-PE (contrôle isotypique pour l'anti-CD86) à une concentration de 1 : 100 (BD Biosciences ; Cat. No. 556653)

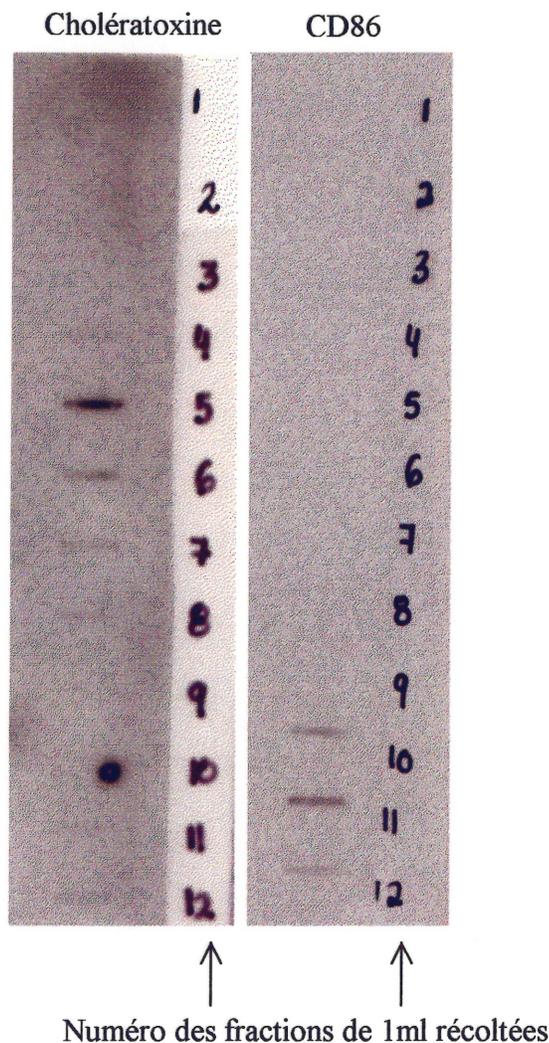
IgG2-FITC (contrôle isotypique pour l'anti-CMH-II) à une concentration de 1 : 100 (BD Biosciences ; Cat. No. 556652)

## 9. RÉSULTATS

Cette section portera tout d'abord sur les différentes étapes d'optimisation de l'isolement des RAFTs via la visualisation des signaux spécifiques de GM1 par la technique de Slot Blot, puis de la localisation de CD86 (B7-2) dans ces microdomaines de sphingolipides également par Slot Blot. L'immunobuvardage sera utilisé suite à une cinétique de stimulation par un SEA afin de mieux visualiser les protéines désirées suite à un SDS-PAGE de 10%. Par la suite, il sera possible de quantifier la migration de CD86 dans les RAFTs par une technique de marquage de surface. Finalement, grâce à une technique d'immunofluorescence, on pourra observer s'il y a co-localisation entre CD86 et le CMH de classe II.

### 9.1 Optimisation du protocole d'isolement des RAFTs

Il faut tout d'abord mentionner que nous avons optimisé les conditions autant pour le marqueur spécifique des RAFTs (GM1) grâce à la cholératoxine que pour CD86. Le protocole initial d'isolement des RAFTs était :  $5 \times 10^7$  cellules, 0.5ml de tampon de lyse pendant 30 minutes et indiquait qu'il était possible d'obtenir une bonne isolement. Ainsi, en observant la figure 11 il est possible de constater qu'avec ce protocole initial, la protéine CD86 ne se retrouve pas dans les fractions RAFTs c'est-à-dire les fractions # 4 à # 7. En effet, un signal très faible de CD86 est retrouvé dans les dernières fractions (# 10, # 11 et # 12). Pour ce qui est de la cholératoxine, il est possible d'observer que l'isolement des fractions RAFTs s'est bien déroulée. Cependant, ce signal spécifique est très faible. Afin de pallier ces manques de signaux spécifiques des RAFTs, une optimisation de ce protocole initial a été entreprise.



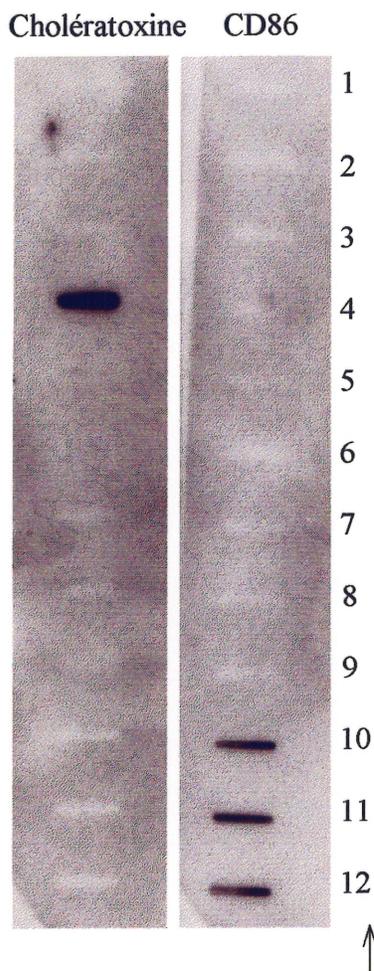
**FIGURE 11: Optimisation de la technique d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par Slot Blot des conditions standards.**

Slot Blot représentant les 12 fractions de 1ml récoltées par ultracentrifugation lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $5 \times 10^7$  cellules. Suite au transfert par Slot Blot, la membrane PVDF a été bloquée puis marquée avec la cholératoxine-HRP à une concentration 1/10 000 et un anticorps monoclonal de souris anti-CD86 à une concentration de 1/100 suivi d'un anticorps secondaire soit un anti-souris-HRP à 1/2000, tous dilués dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/lait 1%. Le signal a été développé avec la chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).

### *9.1.1 Augmentation cellulaire du protocole d'isolement des RAFTs*

L'optimisation de la technique d'isolement des RAFTs a débuté en augmentant la quantité de cellules avant la lyse afin d'obtenir des signaux protéiques plus intenses par Slot Blot. Le nombre de cellules a été augmenté à 100 000 000 cellules Raji. La figure 12 montre que CD86 ne semble pas dans les fractions RAFTs, mais les signaux spécifiques via l'incubation avec un anti-CD86 suggère une augmentation de l'intensité des bandes. CD86 se trouve dans les fractions # 10, # 11 et # 12. Pour ce qui est de la cholératoxine, une seule bande se retrouve à la fraction # 4 donc les fractions dites RAFTs.

Seule la concentration cellulaire a été ici modifiée dans le protocole d'isolement des RAFTs. Afin de mieux optimiser cette technique la quantité de tampon de lyse ajoutée à ces cellules pour lyser correctement ces dernières sera modifiée en conservant la quantité de cellules à  $1 \times 10^8$ .



Numéro des fractions de 1ml récoltées

**FIGURE 12: Optimisation de la technique d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : Analyse par Slot Blot de la variation de la concentration de cellules.**

Slot Blot représentant les 12 fractions de 1ml récoltées par ultracentrifugation lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules sans modifier les autres paramètres d'isolement des RAFTs. Suite au transfert par Slot Blot, la membrane PVDF a été bloquée puis marquée avec la cholératoxine-HRP à une concentration 1/10 000 et un anticorps monoclonal de souris anti-CD86 à une concentration de 1/100 suivi d'un anticorps secondaire soit un anti-souris-HRP à 1/2000, tous dilués dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Le signal a été développé avec la chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).

### *9.1.2 Variation du volume de tampon de lyse du protocole d'isolement des RAFTs*

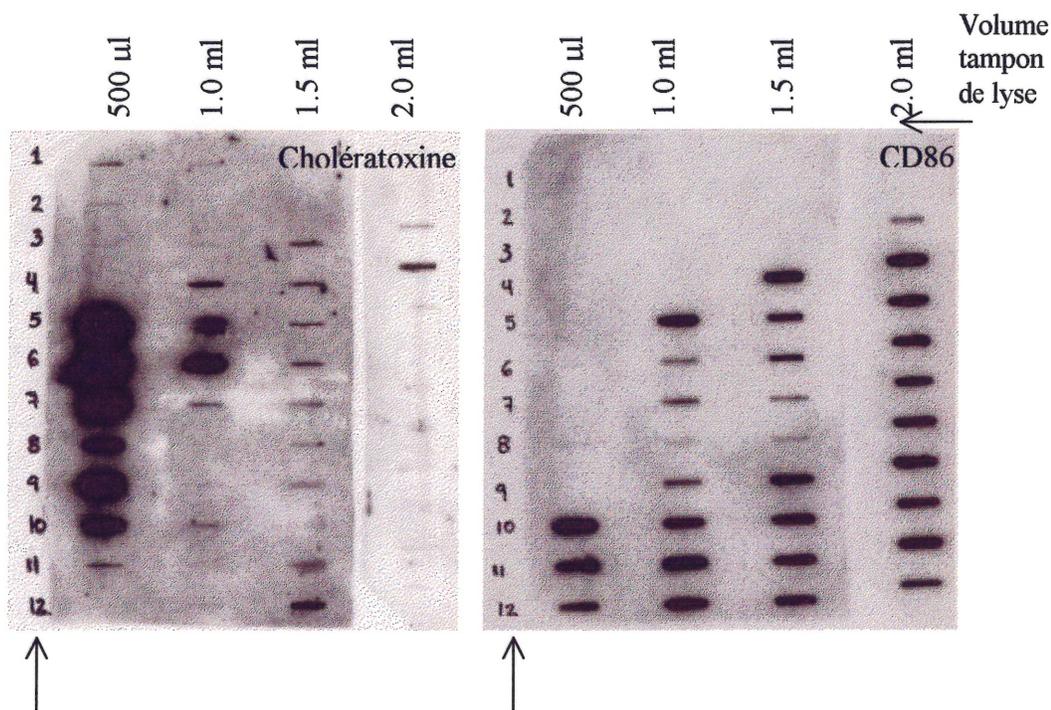
L'un des paramètres importants dans l'isolement des RAFTs est la lyse des cellules afin de préserver les macrostructures membranaires de ces dernières. La densité de cellules étant très élevée, le volume du tampon de lyse a été modifié afin d'isoler de manière optimale ces macrostructures. Le volume du tampon de lyse a été varié de 500 $\mu$ l à 2000 $\mu$ l tout en conservant les autres paramètres du protocole constants c'est-à-dire  $1 \times 10^8$  cellules et 30 minutes de lyse.

La figure 13 montre que le signal de la cholératoxine, c'est-à-dire la portion GM1, à 500 $\mu$ l de tampon de lyse, les bandes se retrouvent dans les fractions RAFTs soit les fractions #4 à #7 mais également dans les dernières fractions soit #8 à #11. À 1.0ml de tampon de lyse les bandes se retrouvent surtout dans les fractions RAFTs. Par contre, à 1.5ml de tampon de lyse, les bandes se distribuent de façon assez similaire au niveau des fractions #3 à #12. Finalement, à 2.0ml de tampon de lyse la bande la plus intense se situe dans la fraction #4.

Pour ce qui est de la protéine CD86, à 500 $\mu$ l de tampon de lyse, les bandes se retrouvent dans les dernières fractions (#10 à #12). À 1.0ml de tampon de lyse, les bandes se situent dans les fractions RAFTs mais également dans les dernières fractions. Par contre, à 1.5ml de tampon de lyse, les bandes se distribuent au niveau des fractions #4 à #12. Finalement, à 2.0ml de tampon de lyse les bandes se répartissent de façon assez similaire au niveau des fractions # 3 à #12.

En comparant la distribution des bandes de la cholératoxine et de CD86, il a été décidé de garder un volume de 1.0ml de tampon de lyse et ce pour le

restant des expériences. En effet, ce volume permet une bonne isolation des bandes dans les fractions RAFTs.



Numéro des fractions de 1ml récoltées

**FIGURE 13 : Optimisation de la technique d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par Slot Blot de la variation du volume de lyse.**

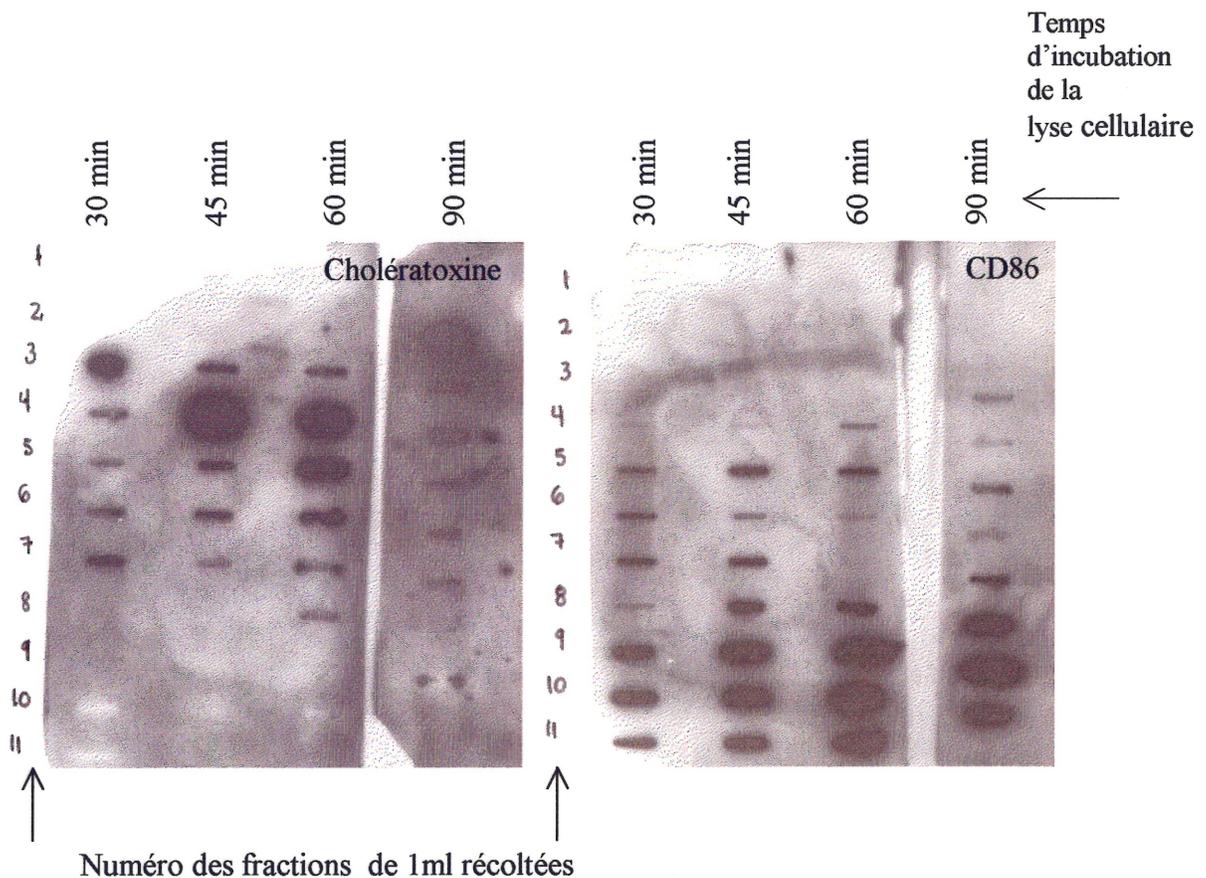
Slot Blot représentant les 12 fractions de 1ml récoltées par ultracentrifugation lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières ont tout d'abord été lysé dans divers volumes d'un tampon (soit 500µl, 1.0ml, 1.5ml et 2.0ml) sans modifier les autres paramètres de l'isolement des RAFTs. Suite au transfert par Slot Blot, la membrane PVDF a été bloquée puis marquée avec la cholératoxine-HRP à une concentration 1/10 000 et un anticorps monoclonal de souris anti-CD86 à une concentration de 1/100 suivi d'un anticorps secondaire soit un anti-souris-HRP à 1/2000, tous dilués dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Le signal a été développé avec la chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).

### 9.1.3 Variation du temps d'incubation de la lyse cellulaire du protocole d'isolement des RAFTs

Un autre des paramètres importants dans l'isolement des RAFTs est le temps de lyse. Afin d'optimiser le temps d'incubation, la concentration cellulaire et le volume du tampon de lyse ont été conservés à  $1 \times 10^8$  cellules et 1 ml de tampon de lyse tel qu'optimisé précédemment alors que la variation du temps d'incubation a été faite de 30 à 90 minutes.

La figure 14 nous montre les résultats de l'expérience. Il est possible de constater que pour le Slot Blot avec la cholératoxine à 30 minutes de lyse cellulaire, les bandes se retrouvent dans les fractions #3 à #7, la plus intense se trouvant à la fraction #3. À 45 minutes de lyse les bandes se retrouvent aussi dans les fractions #3 à #7. Cependant, l'intensité des bandes est très forte, la bande la plus intense se trouvant à la fraction #4. Par contre, pour un temps de lyse de 60 minutes, les bandes se distribuent dans les fractions #3 à #8. Finalement, à 90 minutes de lyse cellulaire les bandes se situent dans les fractions #2 à #7.

Pour ce qui est de la protéine CD86 à 30 minutes de lyse cellulaire les bandes se retrouvent dans les fractions #4 à #11, les plus intenses se trouvant dans les fractions #9, #10 et #11. À 45 minutes de lyse, les bandes se retrouvent aussi dans les fractions #4 à #11, mais cette fois ci les bandes se situant dans les fractions RAFTs sont plus intenses que précédemment. Finalement pour un temps de lyse de 60 et de 90 minutes la distribution des bandes est quasi similaire. En effet, pour 60 minutes de lyse les bandes se retrouvent dans les fractions #4 à #11 alors que pour 90 minutes de lyse les bandes se situent dans les fractions #3 à #11. Ces expériences d'optimisation d'isolement des RAFTs ont été répétées et les résultats sont reproductibles.



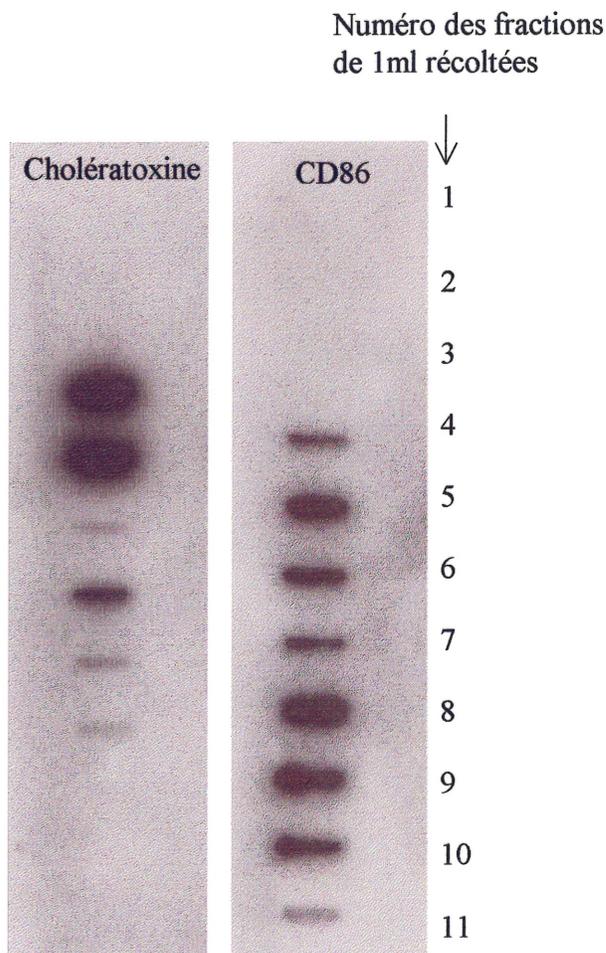
**FIGURE 14 : Optimisation de la technique d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par Slot Blot de la variation du temps d'incubation de la lyse.**

Slot Blot représentant les 11 fractions de 1ml récoltées par ultracentrifugation lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières ont tout d'abord été incubé à divers temps soit 30, 45, 60 et 90 minutes, sans modifier les autres paramètres de l'isolement des RAFTs. Suite au transfert par Slot Blot, la membrane PVDF a été bloquée puis marquée avec la cholératoxine-HRP à une concentration 1/10 000 et un anticorps monoclonal de souris anti-CD86 à une concentration de 1/100 suivi d'un anticorps secondaire soit un anti-souris-HRP à 1/2000, tous dilués dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/lait 1%. Le signal a été développé avec la chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).

#### *9.1.4 Résumé de l'optimisation du protocole d'isolement des RAFTs*

L'optimisation de la technique d'isolement des RAFTs a permis de mettre au point une méthode reproductible d'isolement de ces macrostructures sensibles, entre autres, aux variations de températures, aux conditions de lyse et au temps de lyse.

Il a été déterminé que les conditions optimisées du protocole d'isolement des RAFTs étaient de  $1 \times 10^8$  cellules Raji, 45 minutes de lyse cellulaire et 1.0 ml de tampon de lyse (Figure 15).



**FIGURE 15 : Condition optimale d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par Slot Blot.**

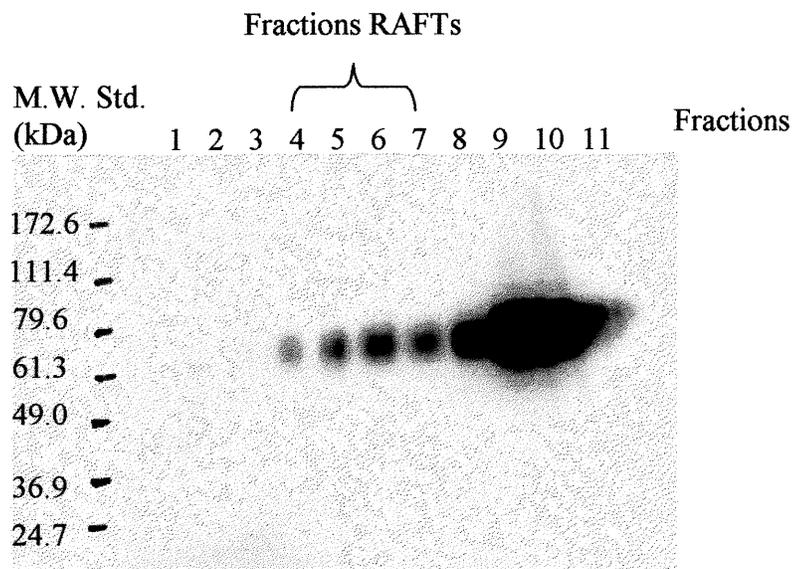
Slot Blot représentant les 11 fractions de 1ml récoltées par ultracentrifugation lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières ont tout d'abord été lysées dans un volume d'un tampon (soit 1.0ml) contenant 1% Triton X-100 et incubées à 45 minutes. Suite au transfert par Slot Blot, la membrane PVDF a été bloquée puis marquée avec la Cholératoxine-HRP à une concentration 1/10 000 et un anticorps monoclonal de souris anti-CD86 à une concentration de 1/100 suivi d'un anticorps secondaire soit un anti-souris-HRP à 1/2000, tous dilués dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Le signal a été développé avec la chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).

## 9.2 Séparation par SDS-PAGE et analyse par immunobuvardage de la présence de CD86 (B7-2) dans les fractions RAFTs

Grâce à la technique de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide il est possible de séparer les protéines en fonction de leur taille puis, à l'aide d'anticorps monoclonaux de les détecter.

La séparation de complexes protéiques a été effectuée sur toutes les fractions de 1ml recueillies par ultracentrifugation sur gradient de saccharose à 4°C sur des gels de SDS-PAGE à 10%. Puis, en utilisant un anticorps monoclonal il a été possible de détecter la présence de CD86 dans les fractions RAFTs.

La figure 16 indique clairement la présence de CD86 au niveau des fractions RAFTs avec un poids moléculaire d'environ 80 kDa. De plus, il est possible de constater que CD86 est réparti majoritairement dans les fractions de haute densité (soit les fractions # 8 à # 11).



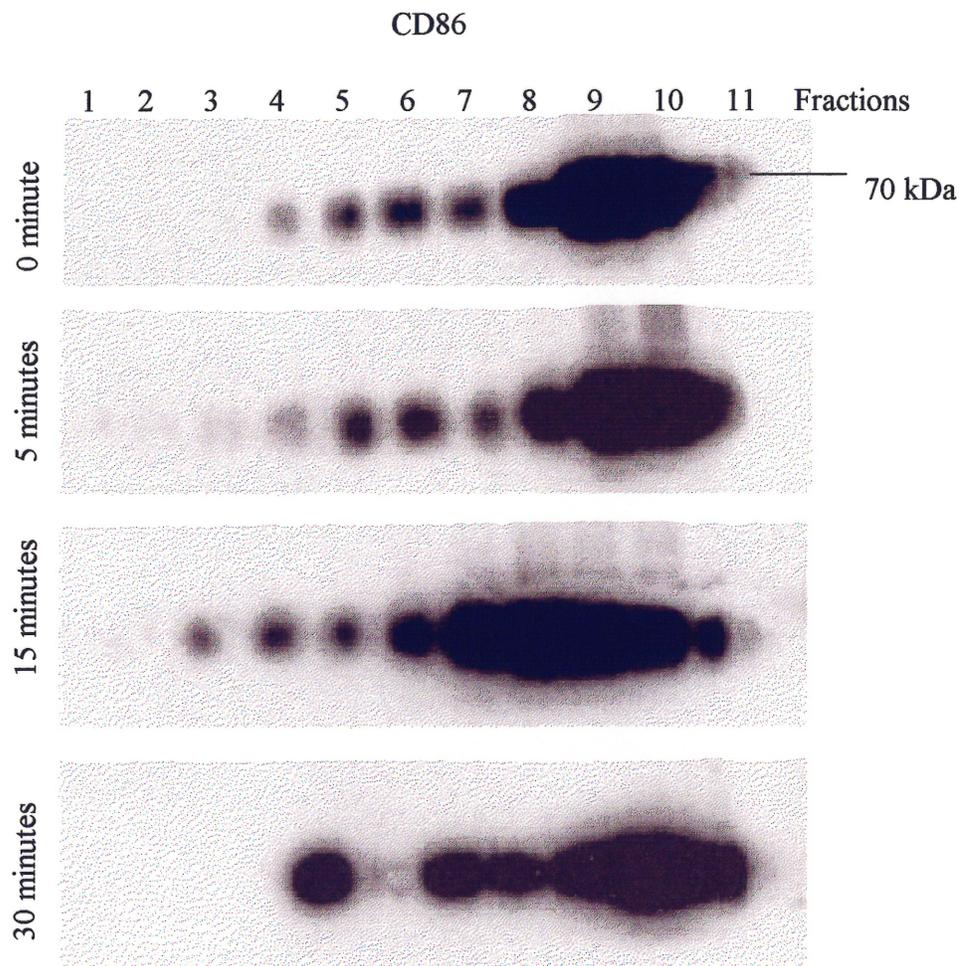
**FIGURE 16 : Condition optimale d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par immunobuvardage de la présence de CD86.**

Immunobuvardage représentant les 11 fractions de 1ml récoltées par ultracentrifugation lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières sont lysées dans 1 ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace. Un anticorps monoclonal de souris anti-CD86 a été utilisé à une dilution de 1/100 suivi d'un anticorps secondaire soit un anti-souris-HRP dilué à 1/2000 dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Le marqueur de poids moléculaire (MW std) Benchmark™ (Pre-Stained Protein Ladder) est exprimé en kilodaltons (kDa) a été utilisé. Les complexes protéiques ont été développés avec la chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).

### 9.3 Séparation par SDS-PAGE et analyse par immunobuvardage de la présence de CD86 (B7-2) et CMH-II dans les fractions RAFTs suivant une cinétique d'activation par un superantigène (SEA) à une concentration de 100ng/ml

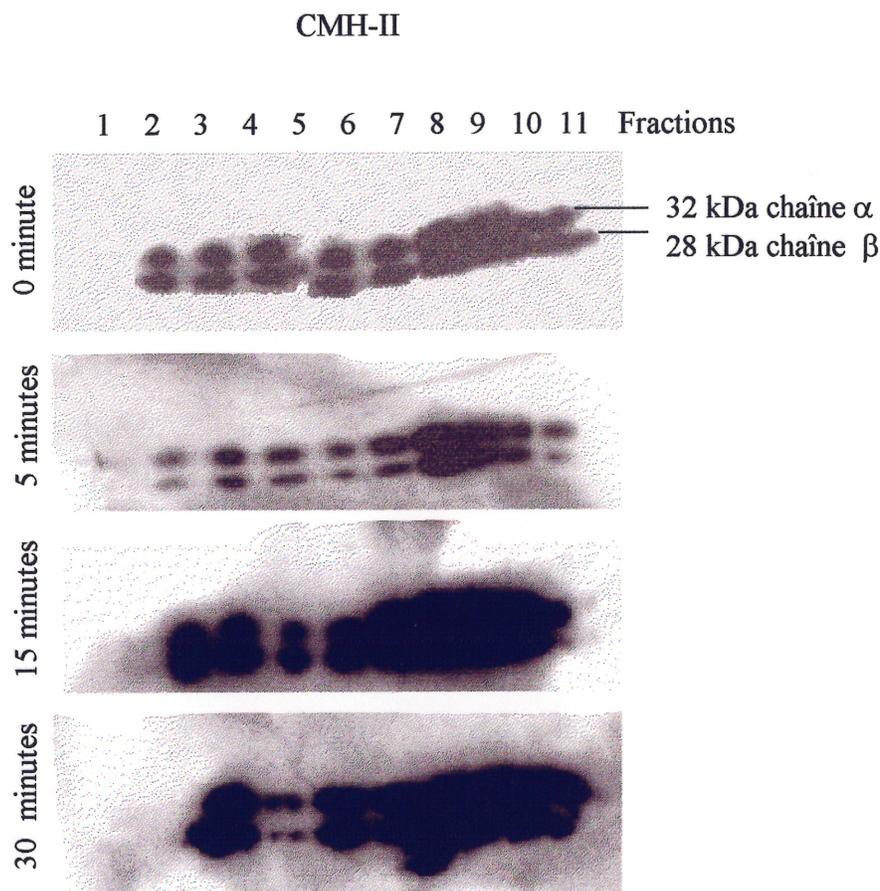
Les cellules Raji ont été traitées avec le superantigène SEA à une concentration de 100ng/ml lors d'une analyse par cinétique de 0, 5, 15 et 30 minutes. Les RAFTs ont été isolés par ultracentrifugation sur un gradient de saccharose à 4°C tel que décrit précédemment. Un gel SDS-PAGE de 10% a été fait sur toutes les fractions de 1 ml récoltées. Un immunobuvardage a été effectué en utilisant un anti-CD86, et un anti-CMH-II.

La figure 17 montre la présence de CD86 dans les fractions RAFTs avant l'addition de SEA, soit à 0 minute, suivi d'une translocation dans les mêmes fractions RAFTs en 30 minutes. La figure 18, montre la présence du CMH-II dans les RAFTs ainsi qu'une distribution dans les fractions isolées similaires à CD86 lors de la cinétique. L'isolement des protéines associées ou non aux RAFTs a été vérifié par l'utilisation de contrôle positif et négatif. La protéine CD45 ne se retrouve pas dans les fractions RAFTs alors que CD40 et l'actine y sont présente, tel que présenté précédemment (Figure 19).



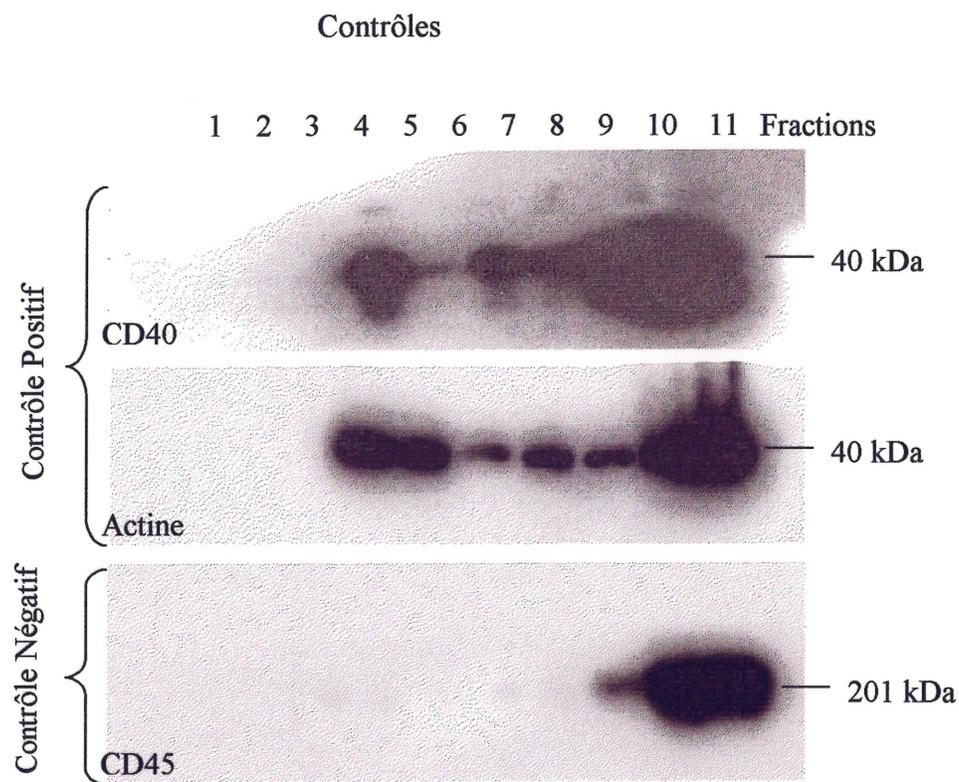
**FIGURE 17 : Cinétique d'activation dans les cellules Raji (0, 5, 15 et 30 minutes) par un SEA à 100ng/ml : analyse par immunobuvardage de la présence d'un CD86.**

Immunobuvardage représentant les 11 fractions de 1ml récoltées par ultracentrifugation lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières sont stimulées avec un SEA à 100ng/ml suivant une cinétique de 0 min, 5 min, 15 min et 30 minutes. Puis les cellules sont lysées dans 1 ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace. Un anticorps monoclonal de souris anti-CD86 a été utilisé à une dilution de 1/100 suivi d'un anticorps secondaire soit un anti-souris-HRP dilué à 1/2000 dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Le signal a été développé avec la chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).



**FIGURE 18 : Cinétique d'activation dans les cellules Raji (0, 5, 15 et 30 minutes) par un SEA à 100ng/ml : analyse par immunobuvardage de la présence du CMH-II.**

Immunobuvardage représentant les 11 fractions de 1ml récoltées par ultracentrifugation lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières sont stimulées avec un SEA à 100ng/ml suivant une cinétique de 0 min, 5 min, 15 min et 30 minutes. Puis les cellules sont lysées dans 1ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace. Un anticorps anti-CMH-II a été utilisé à une dilution ( $\alpha$  1/1000 et  $\beta$  1/500) suivi d'un anticorps secondaire soit un chèvre anti-lapin-HRP à une dilution de 1/2500, dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Le signal a été développé avec chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).

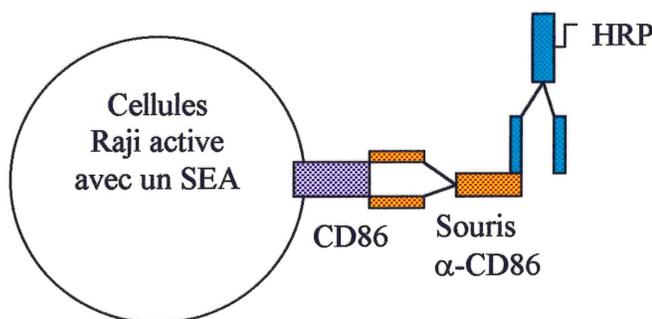


**FIGURE 19 : Contrôle positifs et négatif d'isolement des RAFTs dans les cellules Raji : analyse par immunobuvardage de la présence d'un CD40, CD45 et de l'actine.**

Immunobuvardage représentant les 11 fractions de 1ml récoltées par ultracentrifugation lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières sont stimulées avec un SEA à 100ng/ml puis, les cellules sont lysées dans 1 ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace. Un anticorps monoclonal de souris anti-CD40 (Santa Cruz Biotechnology) et un anticorps monoclonal de souris anti-CD45 (Santa Cruz Biotechnology) ont été utilisés à une concentration 1/1000 suivi d'un anticorps secondaire un anti-souris-HRP à 1/2000 et également un anticorps monoclonal de lapin anti-actine à une concentration de 1/2000 suivi d'un anticorps secondaire chèvre anti-lapin-HRP 1/2500. Les anticorps ont été dilués dans une solution de PBS/Tween-20 0.1%/ lait 1%. Le signal a été développé avec chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).

#### 9.4 Marquage protéique de surface

Le marquage protéique de surface a été entrepris afin de quantifier la migration de CD86 (B7-2) dans les RAFTs. Les cellules Raji ont été activées avec 100ng/ml ou 1ng/ml de SEA durant une cinétique de 0 à 60 minutes. La cinétique a été arrêtée dans du PBS froid et le marquage de surface effectué à 4°C. La concentration d'anticorps monoclonal de souris anti-CD86 a été déterminée à 0.05 µg/50 000 cellules correspondant à la dose optimale pour le marquage de surface de CD86 sur les Raji tel que prédéterminée par FACS (résultats non présentés). 100 millions de cellules étant nécessaires pour l'isolement efficace des RAFTs, nous avons utilisé 100µg d'anticorps par point de cinétique. Le design expérimental de cette expérience est illustré à la figure 20. L'IgG2a (contrôle isotypique) a été utilisé afin de s'assurer l'absence de liaison non-spécifique de l'anticorps primaire tel que déterminé par FACS.

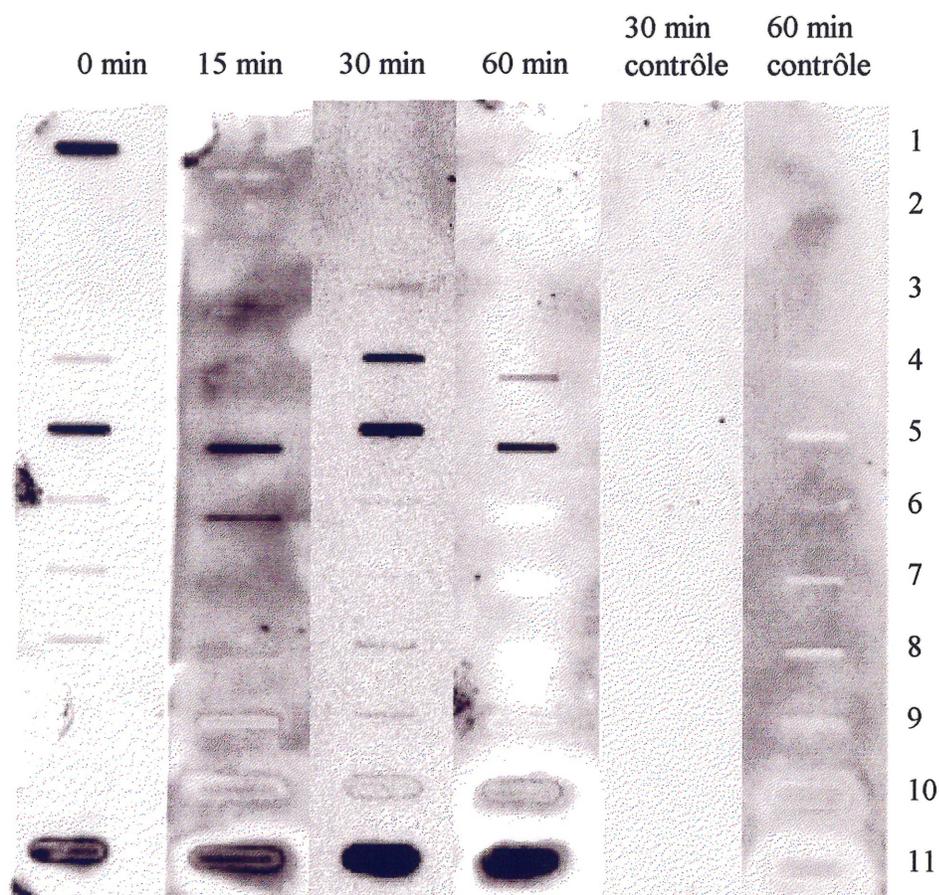


**FIGURE 20 : Design expérimental du marquage protéique de surface.**

La présence de CD86 de surface dans les fractions du gradient de saccharose suivant la séparation par ultracentrifugation a été déterminée par ELISA. L'ELISA permet de quantifier la présence de CD86 dans les RAFTs lors de la cinétique d'activation.

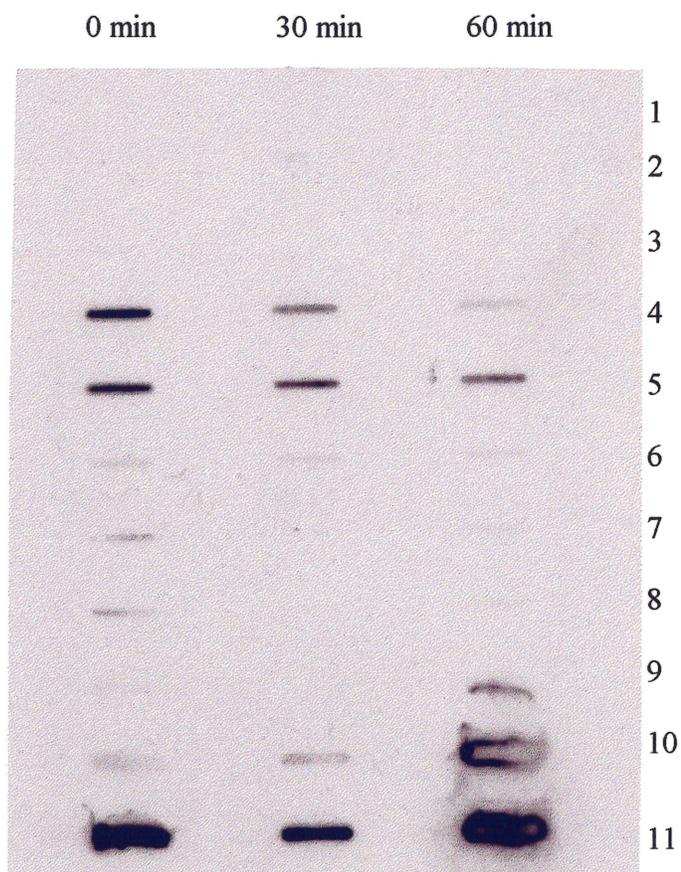
#### *9.4.1 Quantification de CD86 de surface sur les cellules Raji lors d'une cinétique d'activation du SEA à 1ng/ml et 100ng/ml*

La figure 21 représente cette expérience. Premièrement, les contrôles isotypiques à 30 et 60 minutes démontre clairement la spécificité de l'anticorps puisqu'aucun signal HRP est visualisé (Figure 21a). CD86 est présent dans les fractions RAFTs (soit les fractions #4 à #6) pour la cinétique d'activation avec le SEA à 100ng/ml (Figure 21a). Par contre, pour la cinétique avec le SEA à 1ng/ml, la présence de CD86 dans les fractions RAFTs semble diminuer en fonction du temps (Figure 21b).



**FIGURE 21a : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 15, 30 et 60 minutes) avec un SEA à 100ng/ml : analyse par Slot Blot du CD86-HRP.**

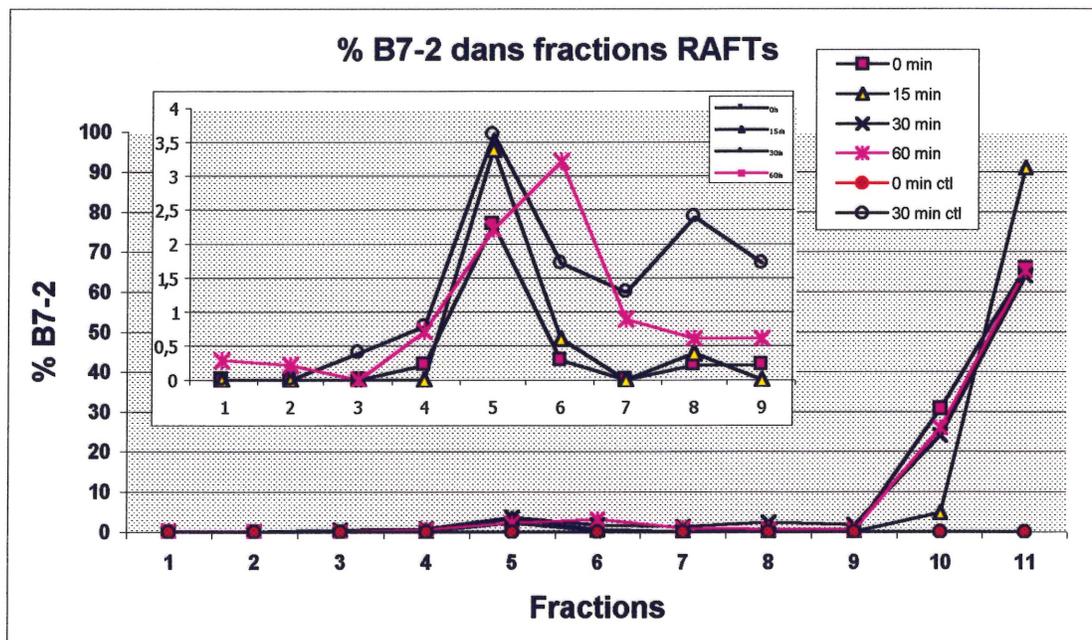
Slot Blot représentant les 11 fractions de 1ml récoltées lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières ont été incubées avec une concentration de SEA à 100ng/ml suivant une cinétique de 0, 15, 30 et 60 minutes puis incubées avec 100µg d'anticorps monoclonal de souris anti- CD86 suivi d'un anticorps secondaire anti-souris-HRP et ce pour chaque intervalle de temps. Puis les cellules sont lysées dans 1ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace suivant le protocole standard d'isolement des RAFTs. Le signal a été développé avec la chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).



**FIGURE 21b : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 30 et 60 minutes) avec un SEA à 1ng/ml : analyse par Slot Blot du CD86-HRP.**

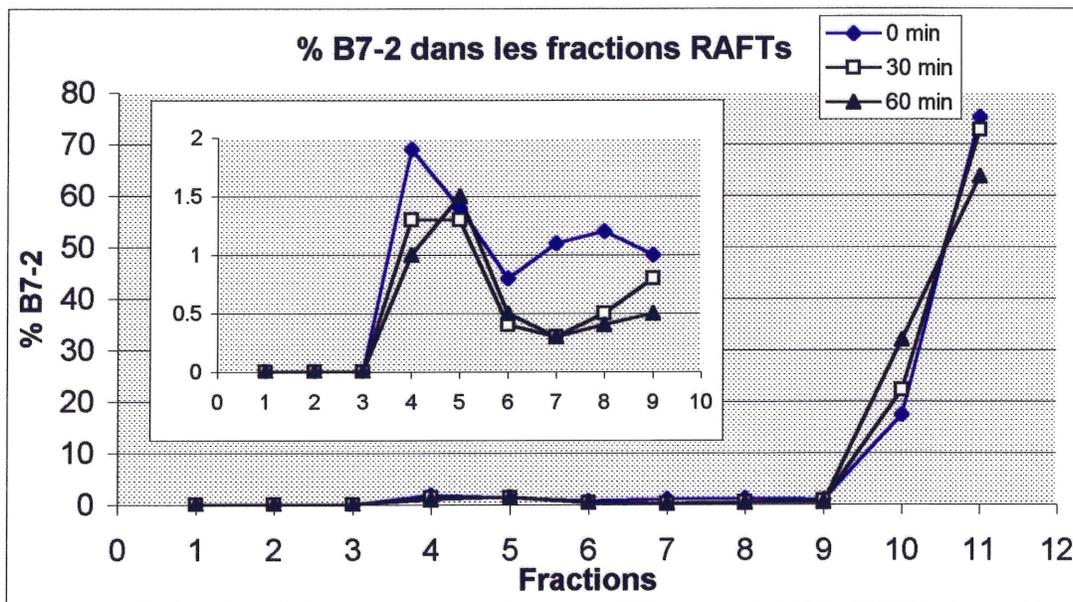
Slot Blot représentant les 11 fractions de 1ml récoltées lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières ont été incubées avec une concentration de SEA à 1ng/ml suivant une cinétique de 0, 30 et 60 minutes puis incubées avec 100µg d'anticorps monoclonal de souris anti-CD86 suivi d'un anticorps secondaire anti-souris-HRP et ce pour chaque intervalle de temps. Puis les cellules sont lysées dans 1ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace suivant le protocole standard d'isolement des RAFTs. Le signal a été développé avec la chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences).

À partir des mêmes complexes protéiques de surface isolés, un ELISA a été effectué afin de quantifier le pourcentage de CD86 (B7-2) dans les RAFTs aux différents intervalles de temps (Figure 22). Les résultats de la figure 22 montre l'activité de la HRP dans chacune des fractions isolées du gradient de saccharose exprimée en pourcentage HRP ( $\% \text{ HRP} = \text{activité HRP de la fraction} / \text{activité HRP totale de toutes les fractions}$ ). Il est possible d'observer à la figure 22a une légère augmentation de l'activité HRP associée à CD86 dans les fractions RAFTs à 30 minutes suivi d'une légère baisse à 60 minutes lorsqu'on utilise un SEA à 100ng/ml. La figure 22b montre, quant à elle, une baisse de l'activité de la HRP associé à CD86 en fonction du temps d'incubation avec le SEA utilisé à une concentration de 1ng/ml.



**FIGURE 22a : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 15, 30 et 60 minutes) par un SEA à 100ng/ml : quantification par ELISA d'un CD86 de surface.**

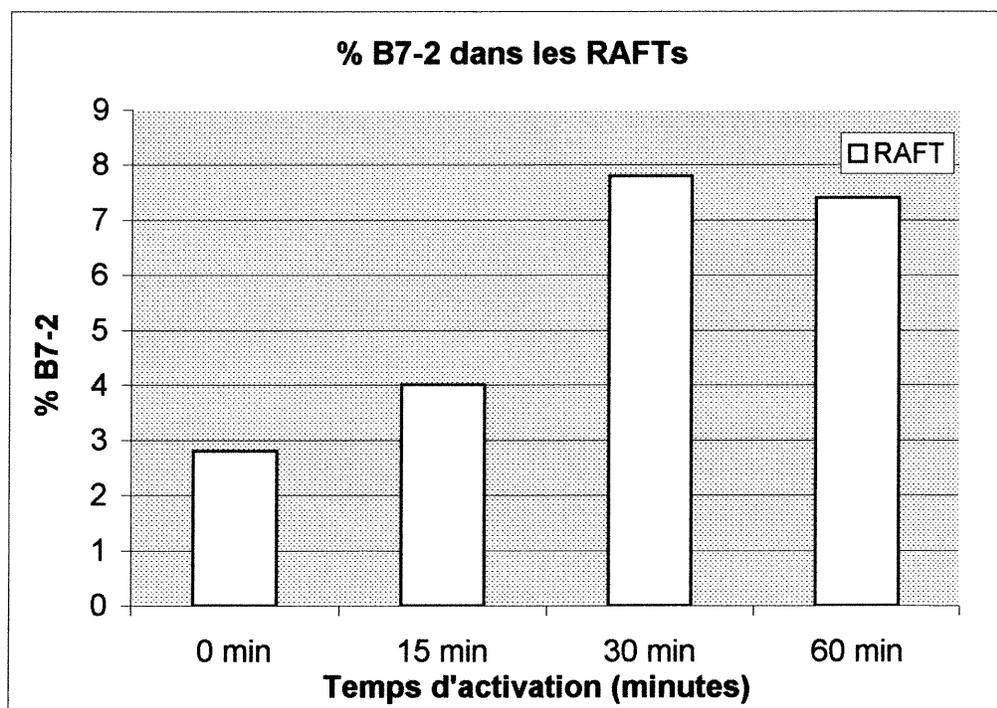
ELISA représentant les 11 fractions de 1ml récoltées lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières ont été incubées avec une concentration de SEA à 100ng/ml suivant une cinétique de 0, 15, 30 et 60 minutes puis incubées avec 100µg d'anticorps monoclonal de souris anti-B-7-2 suivi d'un anticorps secondaire anti-souris-HRP et ce pour chaque intervalle de temps. Puis les cellules sont lysées dans 1ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace suivant le protocole standard d'isolement des RAFTs. Les signaux représentant les fractions 1 à 9 ont été amplifiés afin de mieux visualiser ces derniers. Le signal a été développé avec les substrats adéquats pour la HRP (*horse radish peroxidase*).



**FIGURE 22b : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 30 et 60 minutes) par un SEA à 1ng/ml : quantification par ELISA d'un CD86 de surface.**

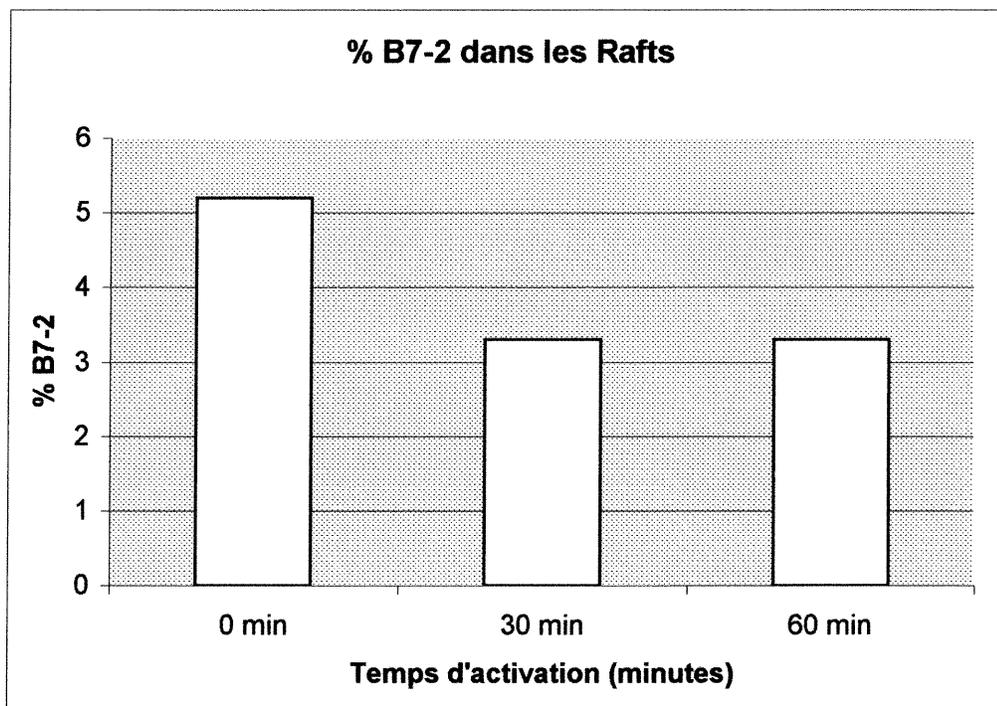
ELISA représentant les 11 fractions de 1ml récoltées lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières ont été incubées avec une concentration de SEA à 1ng/ml suivant une cinétique de 0, 30 et 60 minutes puis incubées avec 100µg d'anticorps monoclonal de souris anti-B-7-2 suivi d'un anticorps secondaire anti-souris-HRP et ce pour chaque intervalle de temps. Puis les cellules sont lysées dans 1ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace suivant le protocole standard d'isolement des RAFTs. Les signaux représentant les fractions 1 à 9 ont été amplifiés afin de mieux visualiser ces derniers. Le signal a été développé avec les substrats adéquats pour la HRP (*horse radish peroxidase*).

La représentation graphique sous forme de pourcentage de CD86 (B7-2) dans les RAFTs (additionne les fractions # 4 à # 7) en fonction du temps est démontrée à la figure 23. Pour la cinétique d'activation à 0 minute, avec le SEA à 100ng/ml (Figure 23a), 2.8% de CD86 de surface se retrouve dans les RAFTs. À 15 minutes, une augmentation à 4% survient pour atteindre par la suite un plateau à 30 minutes où 7,9% de CD86 de surface se trouve dans les RAFTs. Finalement, à 60 minutes une légère diminution du pourcentage de CD86 de surface survient soit environ 7%. La cinétique d'activation avec le SEA à 1ng/ml (Figure 23b) révèle qu'environ 5,2% de CD86 de surface se retrouve dans les RAFTs à 0 minute puis ce taux diminue à 3,2% en fonction du temps d'incubation avec le SEA à 1ng/ml.



**FIGURE 23a : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 15, 30 et 60 minutes) par un SEA à 100ng/ml : quantification par ELISA d'un CD86 de surface ou les fractions RAFTs ont été réunies ensemble.**

Représentation graphique sous forme de pourcentage de CD86 dans les RAFTs représentant les 11 fractions de 1ml récoltées lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières ont été incubées avec une concentration de SEA à 100ng/ml suivant une cinétique de 0, 15, 30 et 60 minutes puis incubées avec 100µg d'anticorps monoclonal de souris anti-CD86 suivi d'un anticorps secondaire anti-souris-HRP et ce pour chaque intervalle de temps. Puis les cellules sont lysées dans 1ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace suivant le protocole standard d'isolement des RAFTs.



**FIGURE 23b : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 30 et 60 minutes) par un SEA à 1ng/ml : quantification par ELISA d'un CD86 de surface ou les fractions RAFTs ont été réunies ensemble.**

Représentation graphique sous forme de pourcentage de CD86 dans les RAFTs représentant les 11 fractions de 1ml récoltées lors de l'isolement des RAFTs sur gradient de saccharose à 4°C à partir de cellules Raji à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules. Ces dernières ont été incubées avec une concentration de SEA à 1ng/ml suivant une cinétique de 0, 30 et 60 minutes puis incubées avec 100µg d'anticorps monoclonal de souris anti-CD86 suivi d'un anticorps secondaire anti-souris-HRP et ce pour chaque intervalle de temps. Puis les cellules sont lysées dans 1ml de tampon de lyse contenant 1% Triton X-100 et incubées pendant 45 minutes sur glace suivant le protocole standard d'isolement des RAFTs.

## 9.5 Immunofluorescence des cellules Raji : Cholératoxine-FITC et CD86-PE

La technique d'immunofluorescence permet de visualiser à l'aide d'un microscope la présence de protéines de surface ou intracellulaire. La translocation de CD86 (B7-2) dans les RAFTs suite à l'activation par un SEA ainsi que la co-localisation de CD86 avec CMH de classe II des expériences d'immunofluorescence ont été entreprises à l'aide d'un microscope confocal (microscope Leica DM1RBE ; Heidelberg, Allemagne) et du logiciel Leica (Leica confocal software version 2.00).

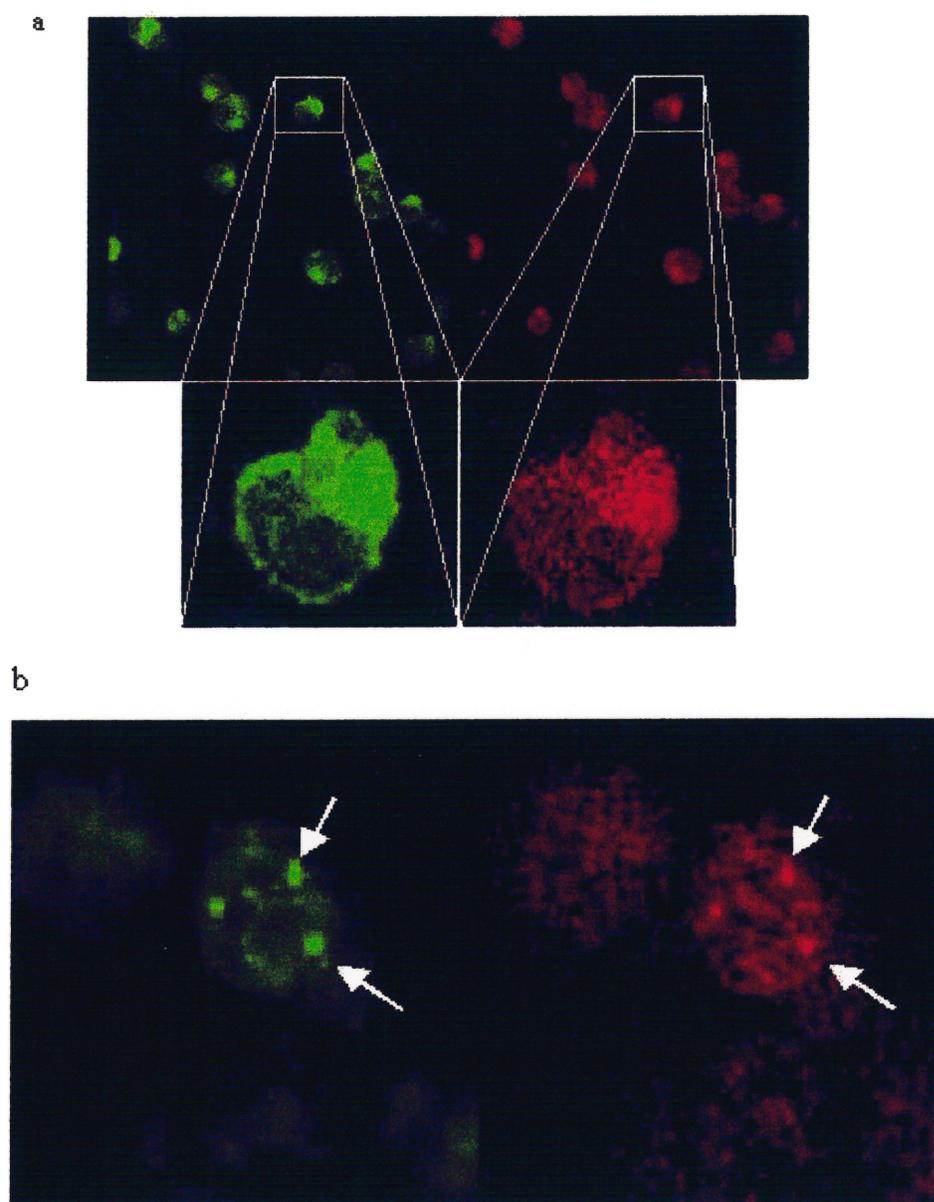
La cholératoxine-FITC a été utilisée afin de visualiser les RAFTs au niveau de la membrane cellulaire alors qu'un anticorps de souris anti-CD86 couplé au marqueur PE a été utilisé afin de révéler la présence de CD86. Le signal FITC émet une fluorescence verte alors que le signal PE émet une fluorescence rouge. La concentration de ces anticorps a préalablement été établie lors du protocole d'optimisation d'immunofluorescence (résultats non présentés).

Comme il a été déjà établi par Slot Blot, par immunobuvardage ainsi que par ELISA, une stimulation des cellules Raji avec un SEA à une concentration de 100ng/ml est optimale à la translocation de CD86 dans les RAFTs (pour une concentration cellulaire de  $1 \times 10^8$ ). Des études de localisation de surface par immunofluorescence ont été entreprises. La figure 24a, présente une première expérience visant à optimiser les conditions d'immunofluorescence pour le CD86-PE et la cholératoxine-FITC. Tel que visualisé, CD86 (rouge) et les RAFTs (vert) se retrouvent partout au niveau de la surface membranaire de la cellule pour les Raji non stimulées.

Suite à une optimisation des conditions de stimulation des cellules Raji, une concentration optimale de 1ng/ml de SEA / 50 000 cellules a été utilisée au

cours des études d'immunofluorescence (résultats non présentés). Se basant sur la cinétique de translocation des RAFTs ainsi que du marquage de surface, une cinétique de 60 minutes a aussi été utilisée. La figure 24b présente le résultat d'une stimulation de 30 minutes avec un SEA à 1ng/ml. Il est possible de constater la présence d'amas au niveau des cellules par la fluorescence verte émise par la cholératoxine-FITC. Ce phénomène est absent sans stimulation au SEA. Il est également possible d'observer la présence de CD86 dans ces mêmes amas. En effet, comme mentionné pour les expériences de marquage de surface (section 9.4) il y a toujours un faible pourcentage de CD86 (8% après stimulation) qui se localise dans les fractions RAFTs.

Ces résultats semblent donc démontrer que suite à une stimulation par un SEA à 1ng/ml (50 000 cellules), une portion de CD86 se transloque vers les RAFTs.



**FIGURE 24 : Co-localisation de CD86 et des RAFTs par immunofluorescence.**

Immunofluorescence de surface des cellules Raji avec la cholératoxine-FITC et le CD86-PE. Les cellules (a) non traitées ou (b) traitées pendant 30 minutes avec un SEA à 1 ng/ml. Le protocole d'immunofluorescence a été suivi comme décrit précédemment. Les flèches pointent sur les amas de CD86 et les RAFTs formés à la surface membranaire.

## 9.6 Immunofluorescence des cellules Raji : CMH-II-FITC et CD86-PE

La présence de CD86 (B7-2) dans les amas co-localisé avec les RAFTs suite à l'activation par le SEA a été suivie par la co-localisation de CD86 avec le CMH de classe II, puisque la formation des amas est représentative de la multimérisation du CMH-II par le SEA à la surface de la cellule et non des RAFTs eux-mêmes.

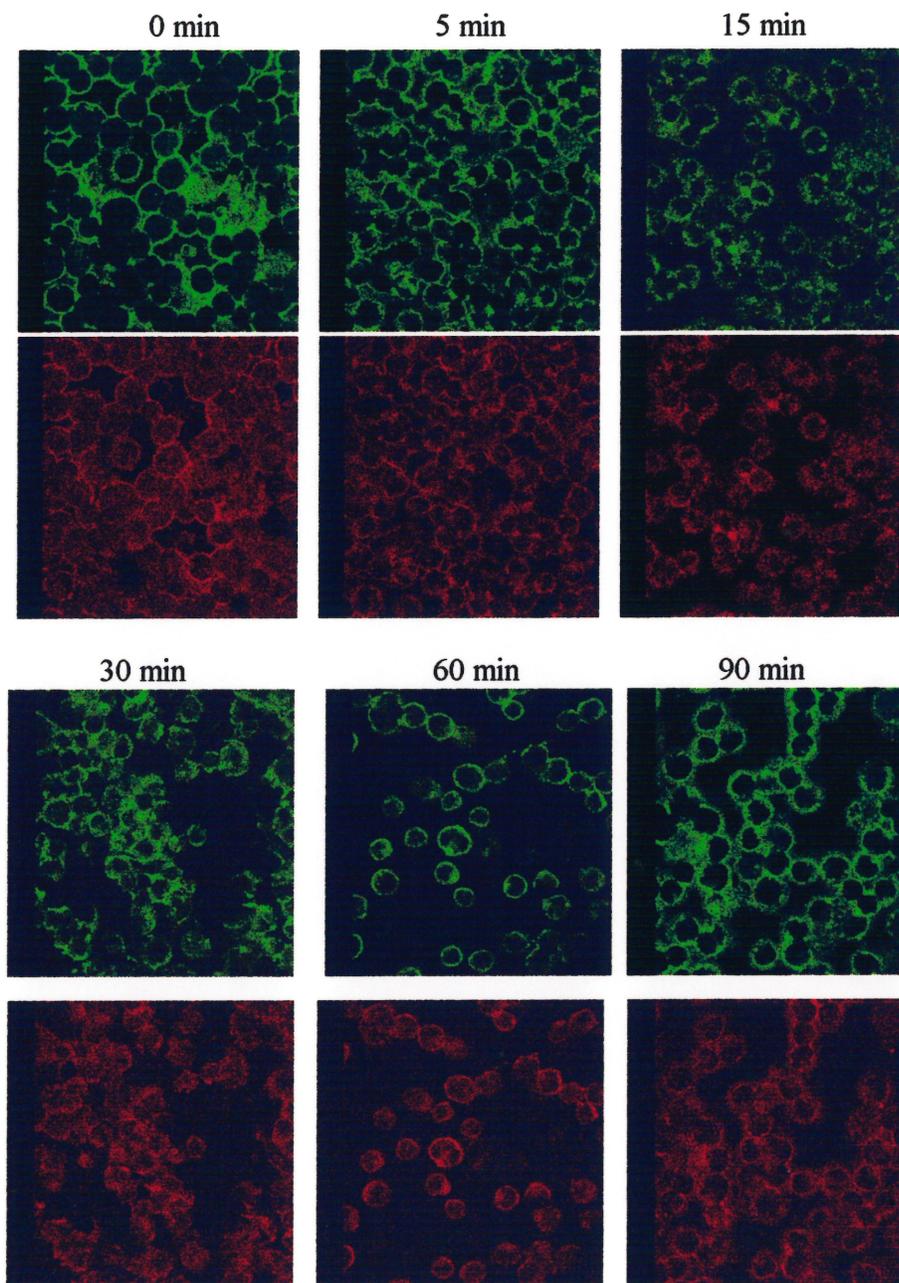
Une cinétique d'activation par le SEA à 1ng/ml, soit 0, 5, 15, 30, 60 et 90 minutes a été effectuée. Les signaux de fluorescence représentant le CD86-PE (rouge) et un CMH-II-FITC (vert).

La figure 25 montre qu'après 5 minutes de stimulation avec un SEA à 1ng/ml, le CMH de classe II commence à s'oligomériser, c'est-à-dire former des amas de fluorescence. À partir de 15 minutes, CD86 est co-localisé avec le CMH-II/RAFTs pour atteindre un maximum à 30 minutes. À 60 minutes la co-localisation semble diminuer et demeure stable jusqu'à 90 minutes.

Une superposition des images de fluorescence de CD86-PE et CMH-II-FITC à 30 minutes dans une expérience subséquente permet de bien visualiser la co-localisation des 2 protéines (Figure 26a). La superposition du rouge et du vert se visualise par la coloration jaune sur la photo. Il est clair qu'à 30 minutes, CD86 est co-localisé à la surface des cellules Raji avec le CMH-II. La superposition à 0 minute génère qu'une faible co-localisation (résultats non présentés).

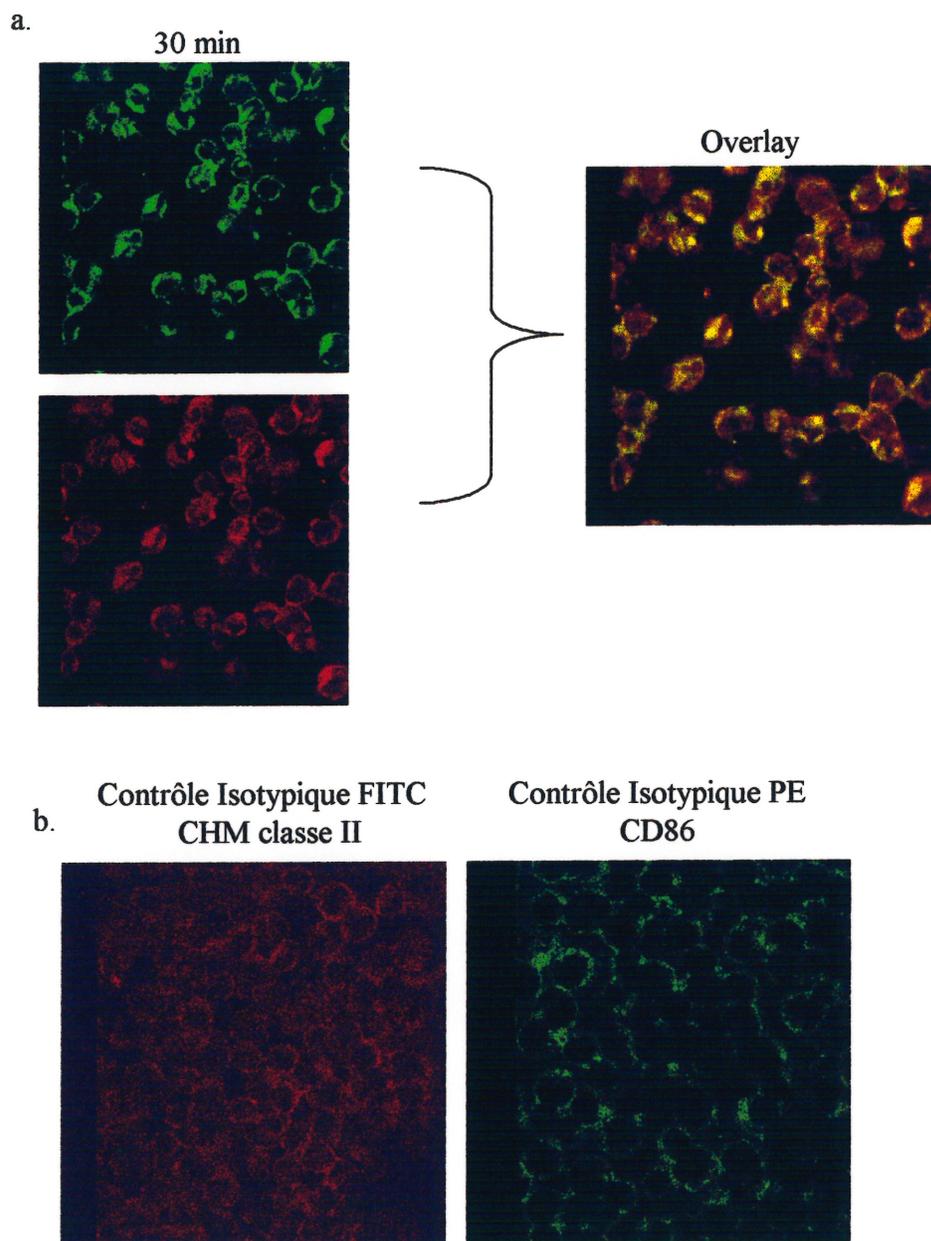
Il a également été effectué des contrôles isotypiques pour CD86-PE et CMH-II-FITC afin de s'assurer de la spécificité de nos signaux. Ainsi, pour CD86-PE le contrôle isotypique était un IgG2-PE alors que pour le CMH-II-FITC c'était un IgG2-FITC. Il est possible de constater que les signaux obtenus

sont spécifiques pour les anticorps utilisés et que les contrôles isotypiques ne colorent pas les cellules Raji (Figure 26b).



**FIGURE 25 : Cinétique d'activation des cellules Raji (0, 5, 15, 30, 60 et 90 minutes) par un SEA à 1ng/ml : co-localisation de CD86 et du CMH-II par immunofluorescence.**

Immunofluorescence de surface des cellules Raji avec le CMHII-FITC et le CD86-PE. Les cellules ont été traitées pendant 0, 5, 15, 30, 60 et 90 minutes avec un SEA à 1 ng/ml puis le protocole d'immunofluorescence a été suivi comme décrit précédemment.



**FIGURE 26 : Co-localisation de CD86 et CMH-II des contrôles isotypiques CD86 et CMH-II par un SEA à 1ng/ml pendant 30 minutes.**

Immunofluorescence de surface des cellules Raji avec le CMHII-FITC et le CD86-PE. Les cellules (a) ont été traitées pendant 30 minutes avec un SEA à 1 ng/ml puis le protocole d'immunofluorescence a été suivi comme décrit précédemment. Ainsi que les (b) contrôles isotypiques pour le CMH-II et le CD86.

## **10. DISCUSSION**

Un des évènements principaux dans le développement de l'immunité est l'activation des cellules T. Au centre de ce processus se retrouve le TCR qui déclenche l'activation par une interaction spécifique avec l'antigène présenté par le CMH des CPAs (Dustin et Shaw, 1999). La jonction spécialisée entre le lymphocyte T et la CPA consiste en un amalgame de TCR entouré de molécules d'adhésion et se nomme synapse immunologique (Garkoui *et al.*, 1999 ; Dustin et Shaw, 1999).

Une activation efficace des cellules T nécessite l'engagement d'au moins deux types de récepteurs de surfaces des cellules T. Ce phénomène a été interprété comme étant un « modèle à deux signaux » et propose que l'activation des cellules T nécessite un signal du TCR et un second signal provenant d'une molécule de co-stimulation (CD28) (Dustin et Shaw, 1999). La formation de la synapse immunologique stable et l'activation de la machinerie enzymatique sous-jacente vont être facilitées par un second mécanisme qui est celui de la coalescence de radeaux lipidiques (ou GEMs *glycosphingolipid enriched membranes* ou microdomaines ou RAFTs) au niveau de la membrane plasmique.

La membrane plasmique a longtemps été perçue comme étant une mosaïque fluide composée d'une bicouche phospholipidique. Or, depuis quelques années ce concept a quelque peu changé. En effet, la membrane plasmique est dorénavant définie comme étant également composée de microdomaines enrichis de glycophospholipides nommés RAFTs. Ces microdomaines peuvent être séparés par un gradient discontinu de saccharose à 4°C et par la suite être visualisés rapidement par Slot Blot.

Il a été proposé que CD28 induit une réorganisation de la synapse immunologique en recrutant les RAFTs à proximité de celle-ci (Viola *et al.*, 1999). Ce phénomène permet donc l'activation des cellules T et des cascades intracellulaires qui en découlent. De plus, dû à la proximité des membranes et l'activation rapide des cellules T, il est possible d'hypothétiser que CD86 (B7-2) serait également dans les RAFTs par analogie entre la CPA et les cellules T.

### 10.1 Optimisation du protocole d'isolement et RAFTs par Slot Blot

Nous avons tout d'abord optimisé le protocole d'isolement des RAFTs pour le modèle cellulaire qui a été utilisé au cours de cette étude soit les cellules Raji. Initialement, nous avons varié la concentration cellulaire de  $5 \times 10^7$  à  $1 \times 10^8$  cellules afin d'augmenter le signal. En effet, comme il est possible d'observer en comparant la figure 11 et la figure 12, les bandes sont beaucoup plus intenses pour cette dernière. Mais, suite à cette expérience il semblait clair que CD86 n'était pas présent dans les RAFTs suite à cet isolement puisqu'aucune bande ne se retrouvait dans les fractions #4 à #7. Un signal faible pour la cholératoxine est présent ce qui laisse supposer une faible efficacité dans l'isolement des RAFTs. De plus, la seule bande présente à la figure 12 pour la cholératoxine indique que lors du prélèvement des fractions de 1 ml (section 8.8) tout le nuage glycolipidique représentant les RAFTs se retrouvait dans cette seule fraction et par conséquent une seule bande est représentée au niveau du Slot Blot. Nous avons conclu que la lyse ne pouvait pas bien s'effectuer avec une si grande population cellulaire puisque les cellules Raji sont des cellules volumineuses.

Nous avons donc décidé de faire varier le volume du tampon de lyse de 500  $\mu$ l à 2000  $\mu$ l afin de déterminer quel serait le volume optimal tout en conservant la quantité cellulaire à  $1 \times 10^8$ . En observant la figure 13, il est possible de constater qu'à un faible volume de tampon de lyse (500  $\mu$ l) il semble

impossible de retrouver des fractions RAFTs pour le Slot Blot anti-CD86. À un volume de 1.5ml et de 2.0ml de tampon de lyse, il semble que ceci lyse complètement les cellules car il est possible d'observer une distribution égale des protéines autant pour la cholératoxine que pour CD86. Or, il est possible que ceci soit dû à un effet savon du Triton à ces grands volumes de lyse (phénomène expliqué plus loin). À 1.0ml de tampon de lyse, il semble y avoir un bon isolement des fractions RAFTs tel que visualisée pour la cholératoxine et CD86. Il semble donc y avoir un équilibre entre le volume du tampon de lyse et la quantité de cellules à lyser. L'équilibre pour l'isolement des RAFTs semble être atteint à  $1 \times 10^8$  cellules dans 1ml de tampon de lyse.

Nous avons également optimisé le temps de la lyse. En observant la figure 14, il est possible de constater qu'au temps le plus faible (30 minutes) la lyse ne se fait pas totalement car pour le Slot Blot de la cholératoxine la bande la plus intense se retrouve à la fraction #3 alors que pour le Slot Blot anti-CD86, les bandes se retrouvent dans les dernières fractions. Avec un temps d'incubation plus grand (90 minutes), la lyse est beaucoup trop longue, dénaturant les RAFTs, le signal de la cholératoxine étant très faible dans les fractions #4 à #7. Par contre pour un temps de lyse de 45 et 60 minutes, les résultats sont similaires c'est-à-dire un très fort signal de la cholératoxine dans les RAFTs ainsi que pour CD86. Nous avons opté pour un temps de lyse de 45 minutes puisque ce dernier permettait un isolement mieux défini des fractions RAFTs et de CD86.

Lors de l'optimisation du protocole d'isolement des RAFTs seul un contrôle positif a été utilisé soit la cholératoxine. En effet, puisque la technique de Slot Blot reposait sur l'isolement des RAFTs un contrôle négatif donc un contrôle non-RAFT ne serait pas nécessaire puisqu'il ne viendrait que confirmer l'absence des RAFTs et ce n'était pas ici le but de cette expérimentation.

La technique de Slot Blot à elle seule ne peut expliquer les différences observées mais il est à remarquer que les différences de signaux retrouvées sur les Slot Blot sont en fait dues à la petite taille des RAFTs qui ont moins de 70 nm de diamètre (Friedrichson et Kurzchalia, 1998 ; Varma et Mayor, 1998). Selon plusieurs auteurs (Hooper, 1999, Varma et Mayor, 1998 ; Harder *et al.*, 1998) la quantité de protéine est toujours plus faible dans les fractions dites RAFTs (soit les fractions #4 à #7) que les dernières fractions (soit les fractions de haute densité) d'où la visualisation des signaux plus faibles dans les fractions RAFTs. De plus, l'isolement même des RAFTs permet également d'expliquer en partie les divers phénomènes observés. Puisque cette technique repose sur l'isolation de microdomaines sphingolipidiques dans des détergents non ioniques à 4°C, il est parfois difficile d'obtenir une bonne isolation due à des changements brusques de température.

Les différences observées pendant l'isolement des RAFTs peuvent aussi être expliquées par l'effet de tension de surface (l'effet savon). Dans le cœur d'un liquide, la force totale d'attraction exercée par toute molécule d'eau sur tous ses voisins est distribuée sphériquement, dans toutes les directions. À la surface de l'eau, les seules molécules d'eau voisines d'une molécule particulière sont à côté ou sous cette molécule de surface, et donc, les forces d'attraction sont dirigées vers le cœur et vers les côtés de chaque molécule. Cette attraction particulièrement forte des molécules de surface pour leurs voisines induit la cohésion de surface, appelée tension de surface. Un détergent est un composé qui nettoie, ici nous avons utilisé le Triton X-100. Ce détergent produira des micelles soient des sphères ou globules d'une substance distribuée dans une autre, habituellement un liquide. Cette micelle diminuera la tension de surface ce qui explique les phénomènes observés à la figure 13 et 14.

Le protocole d'isolement des RAFTs a été optimisé :  $1 \times 10^8$  cellules Raji, 45 minutes de lyse cellulaire et 1.0 ml de tampon de lyse (Figure 15). Ces conditions ont été gardées pour le reste de cette étude.

Les fractions isolées précédemment ont par la suite été migrées sur un gel SDS-PAGE 10% puis un immunobuvardage anti-CD86 a été effectué. La figure 16 permet d'observer la présence de CD86 dans les dernières fractions #9 à #11 mais également dans les fractions RAFTs soient les fractions #4 à #7. CD86 a un poids moléculaire de 80 kDa (Moretta *et al.*, 1994).

La liaison B7/CD28 stimule la prolifération et la différenciation des cellules T via la phosphorylation de la sous-unité  $\zeta$  du TCR. Il a déjà été démontré que CD28 est associé aux RAFTs via une interaction avec la protéine LAT (Martin *et al.*, 2001). Or, puisqu'au niveau des lymphocytes T les microdomaines RAFTs sont près des protéines de régulation à proximité du TCR par analogie avec CD28, il est possible d'hypothétiser que les mêmes mécanismes de régulation sont présents à la surface des CPAs. Ainsi, par analogie avec les connaissances de la signalisation intracellulaire, nous avons émis l'hypothèse que CD86 (B7-2) se comporte de manière analogue à CD28. Cette expérience a donc permis de vérifier l'hypothèse de départ soit que la protéine CD86 (B7-2) est localisée dans les structures insolubles au Triton (RAFTs).

## 10.2 Analyse par SDS-PAGE puis immunobuvardage de la présence de CD86 (B7-2) et CMH-II dans les fractions RAFTs suivant une cinétique d'activation par le SEA à une concentration de 100ng/ml

Nous avons utilisé un SEA (*Staphylococcal Enterotoxin A*) à une concentration de 100ng/ml afin de mimer la synapse immunologique. Nos études préliminaires d'optimisation des cellules Raji à  $1 \times 10^8$  cellules nous ont permis de déterminer à 100ng/ml la concentration optimale (concentration utilisée de 1, 10 et 100ng/ml ; données non présentées). Le superantigène est une molécule bivalente, elle se fixe d'une part à l'extérieur des molécules de CMH-II de la CPA et d'autre part à l'extérieur du TCR des lymphocytes en reconnaissant certaines chaînes V $\beta$ . Il peut aussi lier 2 molécules de CMH-II et permettre ainsi son oligomérisation. Le SEA oligomérise donc la molécule de CMH-II et peut induire les cascades cellulaires à partir de cette dernière.

Nous avons émis l'hypothèse que CD86 pourrait se transloquer dans les RAFTs suite à la liaison du CMH-II avec un superantigène, par analogie à CD28 sur les cellules T. En effet, il a déjà été démontré que CD86 se co-localise intracellulairement avec le CMH de classe II suite à l'absorption d'un antigène dans les cellules dendritiques. En observant la figure 17, il est possible de constater qu'à partir de 30 minutes CD86 se transloque dans les RAFTs alors qu'à la figure 18 le CMH-II se retrouve constitutivement dans les RAFTs tel que démontré par Anderson *et coll.*, 2000. Il faut également prendre note que CD86 se distribue de manière analogue au CMH-II suite à l'activation avec le SEA. Des contrôles positifs et négatifs ont été faits afin de venir valider les résultats obtenus soit les protéines CD40, l'actine et CD45 (Figure 19).

CD40 a déjà été démontré comme jouant un rôle central dans la stimulation des cellules B (Korthauer *et al.*, 1993 ; Allen *et al.*, 1993). De plus, les signaux engendrés par CD40 (section 1.7) semblent dépendre de son

recrutement dans les RAFTs au niveau des cellules B (Hostager *et al.*, 2000) et des cellules dendritiques (Vidalain *et al.*, 2000). Le recrutement de CD40 dans les RAFTs est nécessaire pour l'initiation de la signalisation (Grassmé *et al.*, 2002). CD40 est donc un excellent contrôle positif pour l'isolement des RAFTs. Il est possible de le constater en observant la figure 19 que CD40 est bel et bien localisé dans les fractions RAFTs (#5 à #7).

L'actine, une protéine globulaire, constitue l'élément principal des microfilaments ; elle est présente dans toutes les cellules eucaryotes et y est souvent la plus abondante. Chaque molécule d'actine est un polypeptide simple de 375 acides aminés (40 kDa) associé à une molécule d'ATP. L'actine est disposée différemment dans chaque cellule : il n'y a donc pas deux cellules identiques. Presque toutes les cellules présentent cependant un réseau assez dense de microfilaments entrecroisés et fixés à la face cytoplasmique (face interne) de la membrane plasmique, réseau qui consolide la surface de la cellule. Il est important de noter que l'actine stabilise la synapse immunologique. L'actine du cytosquelette procure une contrainte au niveau de la mobilité des RAFTs ce qui permet une plus grande stabilité au niveau des ces microdomaines. L'actine est liée à plusieurs protéines membranaires et se retrouve dans les RAFTs de manière non spécifique (Acuto et Cantrell, 2000 ; Ikonen, 2001 ; Wülfing et Davis, 1998). Nous avons donc utilisé un anticorps anti-actine comme contrôle positif. Il est possible de constater sur la figure 19, l'actine est présente au niveau des fractions RAFTs mais également au niveau des dernières fractions puisque l'actine est une protéine très abondante au niveau du cytosquelette.

CD45 est une protéine transmembranaire présente en abondance dans tous les leucocytes et fait partie de la famille Src (section 1.6.2 et 1.6.4). Les membres de la famille Src possèdent à la fois des sites de régulation positif et négatif qui sont tous deux des substrats potentiels de CD45. La

phosphorylation de ces sites permet de réguler l'activité enzymatique. Il est bien établi que CD45 peut réguler à la fois positivement mais aussi négativement l'activité des Src (Ashwell et D'Oro, 1999). En fait, la possibilité pour le CD45 d'envoyer selon les cas des signaux divergents dépend de sa localisation. En quiescence, CD45 déphosphoryle les kinases sur leurs deux sites ce qui a pour effet de les rendre inactives. Après contact avec l'antigène, les protéines membranaires se re-localisent, les protéines kinases s'associent aux complexes formés par le récepteur de l'antigène et la composition lipidique de la membrane se modifie pour former des structures appelées RAFTs. À l'intérieur de ces microdomaines, où est exclu CD45, sont regroupés toutes les protéines nécessaires à l'activation de la cellule éloignant ainsi le CD45 du TCR, empêchant ainsi la déphosphorylation des ITAM et avoir un effet inhibiteur sur l'activation lymphocytaire (Janes *et al.*, 1999 ; Janes *et al.*, 2000 ; Cheng *et al.*, 1999). CD45 a donc été utilisé comme contrôle négatif. En observant la figure 19 il est possible de constater que CD45 ne se retrouve pas dans les fractions RAFTs.

Nous avons donc réussi à démontrer par l'isolement des RAFTs et par l'analyse protéique par Slot Blot et immunobuvardage que CD86 est présent dans les fractions RAFTs et est possiblement associé au CMH de classe II. De plus, l'activation par le SEA, qui mime la synapse immunologique, semble permette la migration de CD86 dans les RAFTs.

### 10.3 Marquage de surface

Le marquage de surface a été entrepris afin de quantifier la migration de CD86 (B7-2) dans les fractions RAFTs suite à une activation par le SEA. Les cellules Raji ont été activées avec 100ng/ml ou 1ng/ml de SEA durant une cinétique de 60 minutes. Par la suite, un Slot Blot direct (sans anticorps ajouté) et un ELISA ont été effectués.

### *10.3.1 Slot Blot et ELISA des cellules Raji activées par une cinétique de SEA à 1ng/ml et de 100ng/ml*

Le marquage de surface a été effectué tel que présenté à la figure 20. Le Slot Blot direct de la figure 21 montre l'activité de la HRP présente sur l'anticorps secondaire lors du marquage de surface et isolé avec CD86 lors du processus d'isolement des RAFTs. Il est possible d'observer la présence de CD86 dans les fractions RAFTs (soit les fractions #4 à #6) pour la cinétique d'activation avec le SEA à 100ng/ml à la figure 21a. Il semble que l'activité de la HRP, et donc de la présence de CD86, soit plus forte à 30 minutes et diminue à 60 minutes (Figure 21a). De plus, le contrôle négatif c'est-à-dire le contrôle isotypique IgG2 avec l'anti-souris-HRP ne génère pas de signaux non-spécifiques.

L'isolement des complexes protéiques de CD86 avec l'anticorps monoclonal anti-CD86 jumelé à l'anti-souris-HRP permet de quantifier l'activité enzymatique de manière beaucoup plus précise qu'un simple Slot Blot. L'activité enzymatique a donc été quantifiée en utilisant le substrat standard de la HRP. Les résultats de cette quantification sont présents à la figure 22 et 23. La figure 22 présente l'activité de la HRP de chaque fraction du gradient de saccharose alors que la figure 23 ne présente que l'addition de l'activité HRP dans les fractions RAFTs et ce, à chaque point de cinétique d'activation. Il est clair à la figure 23a que l'activité HRP augmente dans les RAFTs et ce, à 30 minutes et demeure stable ou diminue légèrement à 60 minutes : 0min; 2.75%, 15min; 4%, 30min; 7.90% et 60min; 7.5%. Le SEA, qui induit l'oligomérisation du CMH-II, semble induire via un mécanisme encore inconnu, la translocation de CD86 dans les fractions RAFTs et ce, en 30 minutes. Il est possible que des cascades intracellulaires soit activées dans les Raji suite à l'interaction entre le SEA et le CMH-II et induise cette translocation de CD86. Ce mécanisme est inconnu. Ceci permet d'induire une

synapse immunologique optimale via l'interaction entre le CMH-II et le TCR suivi d'une interaction entre CD28 et CD86. Si cette hypothèse est vraie, alors initialement CD86 ne doit pas se trouver présent à la synapse immunologique afin de permettre le recrutement efficace de CD86 à la synapse suivant une interaction positive entre le CMH et le TCR. De manière analogue CD80 ne doit également pas se retrouver à la synapse immunologique. Cette hypothèse a été vérifiée puisque CD86 se transloque suivant une oligomérisation du TCR avec des concentrations optimal de SEA de plus lors de travaux ultérieurs (résultats non présentés) CD80 (B7-1) ne se semble pas se transloquer dans les RAFTs suite à l'activation intracellulaire via le SEA mais semble « sortir » des RAFTs après 90 minutes de stimulation au SEA. Il est à noter que tous ces travaux ont été effectués en duplicata.

La même cinétique a été effectué avec un SEA à 1 ng/ml (figure 21b, 22b et 23b). Il est évident selon la quantification de la migration de CD86, 1ng/ml ne semble pas induire la translocation de CD86. Il est cependant possible qu'à cette concentration de SEA avec  $1 \times 10^8$  cellules, la translocation soit retardée ou encore la concentration n'atteint pas le seuil d'activation des Raji permettant la translocation de CD86.

#### 10.4 Immunofluorescence

Afin de visualiser la translocation de CD86 (B7-2) dans les RAFTs suite à l'activation par un SEA ainsi que la co-localisation de CD86 avec le CMH de classe II, des expériences d'immunofluorescence ont été entreprises. Initialement, la cholératoxine-FITC a été utilisé afin de visualiser les RAFTs au niveau de la membrane cellulaire alors que CD86-PE a été utilisé afin de révéler la présence de CD86. Une optimisation des conditions d'immunofluorescence et d'activation au SEA a permis de déterminer qu'à

1ng/ml, 100 000 cellules/plaques le SEA induit l'oligomérisation du CMH-II (résultats non présentés).

#### *10.4.1 Immunofluorescence des cellules Raji : Cholératoxine-FITC et CD86-PE*

Il est possible d'observer à la figure 24a que lorsque les cellules Raji ne sont pas stimulées avec un SEA, CD86 se retrouve dispersé au niveau de membrane alors que, lorsqu'il y a stimulation grâce à un SEA (1ng/ml) durant 30 minutes, il est possible d'observer des amas au niveau de la membrane, tout en observant la présence de CD86 distribué au niveau du reste de la membrane (Figure 24b). En comparant ces résultats avec le marquage de surface où 2-4% de CD86 est présent dans les RAFTs avant stimulation et 7-8% après stimulation, ces résultats viennent corroborer le marquage de surface effectué précédemment. De plus, il semble y avoir une co-localisation presque parfaite de la cholératoxine et de CD86. Puisque le SEA se lie et oligomérisé le CMH-II, la présence d'amas de la cholératoxine-FITC co-localiser avec le CD86-PE suggère une co-localisation CMH-II-CD86 dans les amas protéiques.

#### *10.4.2 Immunofluorescence des cellules Raji : CMH-II-FITC et CD86-PE*

La présence de CD86 dans les amas suite à une activation par le SEA nous a amené à caractériser la co-localisation de CD86 avec le CMH de classe II, puisque la formation d'amas est représentative de la multimérisation du CMH-II par le SEA à la surface de la cellule.

Il a déjà été démontré que le CMH de classe II se retrouve constitutivement dans les RAFTs (Huby *et al.*, 1999). Normalement les RAFTs sur les cellules T et B forment un anneau relativement uniforme autour de la

membrane plasmique des cellules sans activation. Lors d'une cinétique d'activation au SEA, il est possible d'observer à la figure 25 qu'après 5 minutes le SEA multimérise le CMH de classe II, c'est-à-dire qu'il y a formation d'amas au niveau de la membrane. Il est également possible de constater que CD86 co-localise avec le CMH-II après 15 minutes pour atteindre un maximum à 30 minutes (figure 25). Ces données semblent appuyer l'hypothèse de recrutement du CD86 dans les RAFTs suite à la multimérisation. En effet, la co-localisation dans les RAFTs n'est pas simultanée, suggérant l'activation d'une cascade intracellulaire rapide médiée par le SEA et menant au recrutement de CD86 à la synapse immunologique. La superposition des deux images (CMH-II-FITC et CD86-PE) indique qu'il y a effectivement co-localisation à 30 minutes observée par la couleur orange sur la figure 26a.

Ces études d'immunofluorescence nous ont donc permis tout d'abord de visualiser la présence de CD86 (B7-2) dans les RAFTs ainsi qu'une co-localisation spécifique avec le CMH de classe II.

## **11. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

À l'analyse de la littérature, il est évident que très peu de travail a été effectué dans la caractérisation des événements qui se produisent dans les CPAs. Au cours de cette étude, nous avons optimisé les conditions d'isolements des RAFTs dans les cellules Raji et nous avons réussi à localiser CD86 (B7-2) dans ces structures spécialisées. Il a également été possible d'observer que le SEA mime la synapse immunologique en oligomérisant le CMH-II. Le SEA a pour effet de transloquer CD86 dans les RAFTs et de co-localiser CD86 avec le CMH de classe II. Nous avons aussi démontré que la présence de CD86 dans les RAFTs augmente suivant une activation par le SEA. Cette augmentation que nous avons quantifiée semble mener à la co-localisation spécifique avec le CMH-II tel que nous l'avons démontré par immunofluorescence. Il est donc possible de stipuler que lors d'une synapse immunologique l'activation des CPAs via l'interaction CMH-II-TCR mène à un recrutement simultané de CD28 et de CD86, et possiblement à l'exclusion de CD80 (B7-1). Ce recrutement spécifique de CD86 à la synapse immunologique pourrait entraîner via la présence de kinases/phosphatases associées aux mêmes RAFTs que CD86, l'activation des CPAs. Ce recrutement pourrait médier l'activation de cascades intracellulaires, entre autre, soit par les sites de phosphorylation de la queue intracellulaire ou encore via le *GTP binding protein binding site*.

Il subsiste par contre encore des questions telles que : Est-ce que l'activation de la cascade cellulaire du CMH-II est responsable de la translocation de CD86 dans les RAFTs ? ; Est-ce que les phosphatases ou kinases sont associées à CD86 dans les fractions RAFTs et entraînent l'activation de cascades intracellulaires essentielles à l'activité des CPAs dans la réponse immunitaire ? Ce travail est donc une première démonstration d'un rôle potentiel de CD86 dans l'activation des cascades intracellulaires chez les

CPAs. Il serait donc intéressant de poursuivre ces travaux afin d'approfondir nos connaissances sur les protéines affectées et/ou modulées par CD86 (B7-2).

## **12. BIBLIOGRAPHIE**

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., et Pober, J.S. 1997. Cellular and molecular immunology. Third Edition. Saunders Text and Review Series.

Acuto, O., et Cantrell, D. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 165-184.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et Watson, J. D. 1995. Biologie moléculaire de la cellule. Médecine-Sciences Flammarion, Paris.

Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bendell, M.A., Edelhoff, S., Disteché, C.M., Somoneaux, D.K., *et al.*, 1993. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science.* **259**: 990-993.

Anderson, H.A., Hiltbold, E.M., et Roche, P.A. 2000. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nature Immunol.* **1**: 156-162.

Aruffo, A., et Seed, B. 1987. Molecular cloning of a CD28 cDNA by high-efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 8573-8577.

Ashwell, J. D., et D'Oro, U. 1999. CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different (Viewpoint). *Immunology Today.* **20**: 412-416.

Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J.H., Lanier, L.L., et Somoza, C. 1993. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature.* **366**: 76-79.

Beyer, C.F. 1984. A "Dot-immunobinding assay" on nitrocellulose membrane for the determination of the immunoglobulin class of mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*. **67**: 79-87.

Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J., et Sharpe, A.H. 1997. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*. **6**: 303-313.

Brown, M. T., et Cooper, J. A. 1996. Regulation, substrates and functions of Src. *Biochim. Biophys. Acta*. **1287**: 121-149.

Brown, D.A., et London, E. 1998. Functions of lipids Rafts in biological membranes. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**: 111-136.

Brown, D.A., et London, E. 2000. Structure and function of sphingolipid and cholesterol rich membranes Rafts. *J. Biol. Chem.* **275**: 17221-17224.

Brunet, J.F., Denizot, F., Luciani, M.F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.G., et Golstein, P. 1987. A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. *Nature*. **328**: 267-270.

Cantrell, D. 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 259-274.

Cardine, A.M., et Schraven, B. 1999. Coupling the TCR to downstream signaling pathways; the role of cytoplasmic and transmembrane adaptor proteins. *Cell. Signal.* **11**: 705-712.

Chambers, C.A., et Allison, J.P. 1999. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**: 203-210.

Cheng, P.C., Dykstra, M.L., Mitchell, R.N., et Pierce, S.K. 1999. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J. Exp. Med.* **190**: 1549-1560.

Cooke, M. P., et Perlmutter, R. M. 1989. Expression of a novel form of the fyn proto-oncogene in hematopoietic cells. *New. Biol.* **1**: 66-74.

Crabtree, G.R. 1999. Generic signals and specific outcomes: signaling through  $Ca^{2+}$ , calcineurine, and NF-AT. *Cell.* **96**: 611-614.

Davis, M. M., et Bjorkman, P. J. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* **334**: 395-402.

Darnell, J., Lodish, H., et Baltimore, D. 1993. Biologie moléculaire de la cellule. 2<sup>ème</sup> Édition. De Boeck Université.

Denhardt, D.T. 1996. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signaling. *Biochem. J.* **318**: 729-747.

Duplay, P., Thome, M., Herve, F., et Acuto, O. 1994. p56lck interacts via its Src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J. Exp. Med.* **179**: 1163-1172.

Dustin, M.L., et Cooper, J.A. 2000. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature Immunology.* **1**: 23-29.

Dustin, M.L., et Shaw, A.S. 1999. Costimulation: building an immunological synapse. *Science*. **283**: 649-650.

Doty, R.T., et Clark, E.A. 1996. Subcellular localization of CD80 receptors is dependent on an intact cytoplasmic tail and is required for CD28-dependent T cell costimulation. *J. Immunol.* **157**: 3270-3279.

Doty, R.T., et Clark, E.A. 1998. Two regions in the CD80 cytoplasmic tail regulate CD80 redistribution and T cell costimulation. *J. Immunol.* **161**: 2700-2707.

Fargeas, C.A., Truneh, A., Reddy, M., Hurle, M., Sweet, R., et Sékaly, R.P. 1995. Identification of residues in the V domain of CD80 (B7-1) implicated in functional interactions with CD28 and CTLA-4. *J. Exp. Med.* **182**: 667-675.

Freeman, G.J., Freedman, A.S., Segil, J.M., Lee, G., Withman, J.F., et Nadler, L.M. 1989. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J. Immunol.* **143**: 2714-2722.

Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A., Lombard, L.A., Gray, G.S., et Nadler, L.M. 1993. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*. **262**: 909-911.

Friedrichson, T., et Kurzchalia, T. V. 1998. Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature*. **394**: 802-805.

Garkoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., et Dustin, M.L. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. **285**: 221-227.

Gawler, D.J. 1998. Points of convergence between Ca<sup>2+</sup> and Ras signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1448**: 171-182.

Germain, R. N. 1997. T-cell signaling: the importance of receptor clustering. *Curr. Biol.* **7**: R640-4.

Grassmé, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A., et Gulbins, E. 2002. Ceramide-Rich Membrane Rafts mediate CD40 clustering. *Journal of immunology*. **168**: 298-307.

Greenfield, E.A., Nguyen, K.A., et Kuchroo, V.K. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit. Rev. Immunol.* **18**: 389-418.

Hames, BD. 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. Dans: Gels Electrophoresis of proteins: a practical approach. Oxford. IRL Press LTD. Pp. 1-91.

Harder, T., Scheiffel, P., Verkade, P., et Simons, K. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell. Biol.* **141** : 929-942.

Henry, J., Miller, M.M., et Pontarotti, P. 1999. Structure and evolution of the extended B7 family. *Immunology Today*. **20**: 285-288.

Hooper, N.M. 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid Rafts and caveolae. *Molec. Memb. Biol.* **16**: 145-156.

Hostager, B.S., Catlett, I.M., et Bishop, G.A. 2000. Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J. Biol. Chem.* **275**: 15392-15398.

Huby, R.D.J., Dearman, R.J., et Kimber, I. 1999. Intracellular phosphotyrosine induction by MHC-class II requires co-aggregation with membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* **274**: 22591-22596.

Ikemizu, S., Gilbert, R.J.C., Fennelly, J.A., Collins, A.V., Harlos, K., Jones, E.Y., Stuart, D.I., et Davis, S.J. 2000. Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. *Immunity.* **12**: 51-60.

Ikonen, E. 2001. Roles of lipid Rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**: 470-477.

Imamoto, A., et Soriano, P. 1993. Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice. *Cell.* **73**: 1117-1124.

Iwabuchi, N., Wu, Y., Nguyen, H.P., Ido, E., Kang, J., Bolen, J.B., Burkhardt, A., et Hozumi, N. 1996. Expression of exogenous p59fyn modulates signaling in an immature B cell line, WEHI-231. *Immunol. Letters.* **51**: 181-185.

Janes, P.W., Ley, S.C., Magee, A.I. 1999. Aggregation of lipid Rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell. Biol.* **147**: 447-461.

Janes, P.W., Ley, S.C., Magee, A.I., et Kabouridis, P.S. 2000. The role of lipid Rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Seminars in Immunology.* **12**: 23-34.

Johnson, L.P., L'Italien, J.J., et Schlievert, P.M. 1986. Streptococcal pyrogenic exotoxin type a (scarlet fever toxin) is related to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Mol. Gen. Genet.* **2**: 354-356.

June, C. H., Fletcher, M. C., Ledbetter, J. A., et Samelson, L. E. 1990. Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* **144**: 1591-1599.

Kabouridis, P.S., Janzen, J., Magee, A.L., et Ley, S.C. 2000. Cholesterol depletion disrupts lipid Rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **30**: 954-963.

Kawabuchi, M., Satomi, Y., Takao, T., Shimonishi, Y., Nada, S., Nagai, K., Tarakhovsky, A., et Okada, M. 2000. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature.* **404**: 999-1003.

Korthauer, U., Graf, D., Mages, H.W., Briere, F., Padayachee, M., Malcolm, S., Ugazio, A.G., Notarangelo, L.D., Levinsky, R.J., et Kroczeck, R.A. 1993. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature.* **361**: 539-541.

Kuhns, M.S., Epshteyn, V., Sobel, R.A., et Allison J.P. 2000. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates the size, reactivity, and function of a primed pool of CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 12711-12716.

Lee, K.M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D.K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L.E., Thompson, C.B., et Bluestone, J.A. 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science.* **282**: 2263-2266

Maniatis, T., Fritsch, E.R., et Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press.

Martelli, M.P., Linh, H., Zhang, W., Samelson, L.E., Brierer, B.E. 2000. Signaling via LAT (linker for T-cell activation) and Syk/ZAP70 is required for ERK activation and NFAT transcriptional activation following CD2 stimulation. *Blood*. **96**:2181-2190.

Martin, M., Schneider, H., Azouz, A., et Rudd, C.E. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J. Exp. Med.* **194**: 1675-1681.

McLellen, A.D., Starling, G.C., Williams, L.A., Hock, B.D., et Hart, D.N. 1995. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2064-2068.

Mondino, A., et Jenkins, M.K. 1994. Surface proteins involved in T cell costimulation. *J. Leuk. Stimul.* **55**: 805-815.

Moretta, A., Vitale, M., Sivori, S., Bottino, C., Morelli, L., Augugliaro, R., Barbaresi, M., Pende, D., Ciccone, E., Lopez-Botet, M., *et al.* 1994. Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules. Evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles. *J. Exp. Med.* **180**: 545-555.

Murphy, E.E., Terres, G., Macatonia, S.E., Hsieh, C.S., Mattson, J., Lanier, L., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K., et O'Garra, A. 1994. B7 and interleukin 12 cooperate for the proliferation and interferon  $\gamma$  production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J. Exp. Med.* **180**: 223-231.

Nishizuka, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**: 484-496.

Olszowy, M. W., Leuchtmann, P. L., Veillette, A., et Shaw, A. S. 1995. Comparison of p56lck and p59fyn protein expression in thymocyte subsets, peripheral T cells, NK cells, and lymphoid cell lines. *J. Immunol.* **155**: 4236-4240.

Ormerod, M. G. 1994. Flow cytometry. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford. Pp. 1-2, 18, 25-26, 33-34, 42-43, 47-59.

Ostrov, D.A., Shi, W., Schwartz, J.C.D., Almo, S.C., et Nathenson, S.G. 2000. Structure of murine CTLA-4 and its role in modulating T cell responsiveness. *Science.* **290**: 816-819.

Parolini, I., Topa, S., Sorice, M., Pace, A., Ceddia, P., Montesoro, E., Pavan, A., Lisanti, M.P., Peschle, C., et Sargiacomo, M. 1999. Phorbol ester-induced disruption of the CD4-LcK complex occurs within a detergent-resistant microdomain of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **274**: 14176-14187.

Parsons, J. T., et Weber, M. J. 1989. Genetics of Src: structure and functional organization of a protein tyrosine kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **147**: 79-127.

Plummer, D.T. 1987. An introduction to practical biochemistry. 3<sup>e</sup> Edition. McGraw-Hill book company. Montreal.

Prescott, L., Harley, J.P., et Klein, D.A. 1995. Microbiologie. De Boeck Université.

Rawn, J.D. 1990. Traité de biochimie. Éditions du renouveau pédagogique. Montréal.

- Révillard, J.P. 1995. Immunologie. 2 édition .De Boeck Université, Bruxelles.
- Rudd, C. E., Barber, E. K., Burgess, K. E., Hahn, J. Y., Odysseos, A. D., Sy, M. S., et Schlossman, S. F. 1991. Molecular analysis of the interaction of p56lck with the CD4 and CD8 antigens. *Adv. Exp. Med. Biol.* **292**: 85-96.
- Samelson, L. E., Patel, M. D., Weissman, A. M., Harford, J. B., et Klausner, R. D. 1986. Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell.* **46**: 1083-1090.
- Samelson, L. E., Phillips, A. F., Luong, E. T., et 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.
- Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., et Bluestone, J.A. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* **12**: 431-440.
- Schmedt, C., Saijo, K., Niidome, T., Kuhn, R., Aizawa, S., et Tarakhovsky, A. 1998. Csk controls antigen receptor-mediated development and selection of T-lineage cells. *Nature.* **394**: 901-904.
- Schwartz, J.C.D., Zhang, X., Federov, A.A., Nathenson, S.G., et Almo, S.C. 2001. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature.* **410**: 604-608.
- Seger, R., et Krebs, E.G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**: 726-735.

Shaw, A. S., et Dustin, M. L. 1997. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity*. **6**: 361-369.

Stamper, C.C., Zhang, Y., Tobin, J.F., Erbe, D.V., Ikemizu, S., Davis, S.J., Stahl, M.L., Seehra, J., Somers, W.S., et Mosyak, L. 2001. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature*. **410**: 608-611.

Straus, D. B., Chan, A. C., Patai, B., et Weiss, A. 1996. SH2 domain function is essential for the role of the Lck tyrosine kinase in T cell receptor signal transduction. *J. Biol. Chem.* **271**: 9976-9981.

Straus, D. B., et 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.

Timson Gauen, L. K., Kong, A. N., Samelson, L. E., et Shaw, A. S. 1992. P59fyn tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5438-5446.

Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., et Sharpe, A.H. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. **3**: 541-547.

Towbin, H., et Gordon, J. 1984. Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. *J. Immunol. Methods*. **72**: 313-340.

Van Leeuwen, J.E.M., et Samelson, L.E. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. *Current Opinion in Immunology*. **11**: 242-248.

Varma, R., et Mayor, S. 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*. **394**: 798-801.

Vidalain, P.O., Azocar, O., Servet-Delprat, C., Roubourdin-Combe, C., Gerlier, D., et Manié, S. 2000. CD40 signaling in human dendritic cells is initiated within membrane rafts. *Embo. J.* **19**: 3304-3312.

Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., et Lanzavechia, A. 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*. **283**: 680-682.

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., et Zoller, M. 1992. Recombinant DNA. 2<sup>e</sup> ed. Scientific American Books. New York.

Wange, R.L., et Samelson, L.E. 1996. Complex Complexes: Signaling at the TCR. *Immunity*. **5**: 197-205.

Wülfing, C., et Davis, M. 1998. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science*. **282**: 2266-2269.

Wülfing, C., Sumen, C., Sjaastad, M.D., Wu, L.C., Dustin, M.L., et Davis, M.M. 2002. Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nature Immunology*. **3**: 42-47.

Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., et Harrison, S. C. 1999. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell*. **3**: 629-638.