

Université de Montréal

*Étude des Mécanismes d'Immunodomination
par la Technologie des Tétramères de Complexes Majeurs
d'Histocompatibilité de Classe-I*

par

Guillaume Roy-Proulx

Programme de Sciences biomédicales

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 Sciences biomédicales

Juin, 2001



© Guillaume Roy-Proulx, 2001

W
4
U58
2001
No. 110

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

*Étude des Mécanismes d'Immunodomination
par la Technologie des Tétramères de Complexes Majeurs
d'Histocompatibilité de Classe-I*

présenté par :

Guillaume Roy-Proulx

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jacques Thibodeau,	Président du jury
Claude Perreault,	Directeur de recherche
Hugo Soudeyans,	Membre du jury

SOMMAIRE

Parmi la multitude d'épitopes pouvant être présentés simultanément aux lymphocytes T cytotoxiques, seule une très faible fraction a la capacité d'induire une réponse. Ce phénomène appelé « immunodomination » fait en sorte que des épitopes dits dominants ont la propriété de générer une réponse contre eux-mêmes mais de supprimer celle envers d'autres épitopes, dits alors non-dominants. Ce phénomène dont les bases moléculaires demeurent inconnues, a été défini au niveau cellulaire, sur la base de tests fonctionnels de cytotoxicité. Pour étudier quantitativement ce phénomène, la technologie révolutionnaire des tétramères de complexes majeurs d'histocompatibilité fut utilisée. Spécifique, sensible et directe, cette technique permet d'identifier et de quantifier les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à un antigène donné. Nos études utilisant des tétramères incluant les antigènes mineurs d'histocompatibilité B6^{dom1} et HY, ont démontré que l'immunodomination de HY repose d'abord sur l'absence de prolifération clonale, plutôt que sur l'expansion de T non-fonctionnels. De plus, la disparition de l'immunodomination dans un contexte où les ressources (i.e. les cellules présentatrices d'antigènes (CPA)) ne sont pas un facteur limitant, indique que le modèle de compétition précédemment proposé est modulé par le ratio T : CPAs. La différence entre les cellules T qui reconnaissent l'épitope dominant versus non-dominant est qualitative et non numérique. En effet, les différences de niveaux de O-glycan et de perforine intracellulaire que nous avons observées entre les T spécifiques à B6^{dom1} et HY, suggèrent que l'immunodomination est causée par des différences fonctionnelles entre les lymphocytes T cytotoxiques en compétition. Puisque dans notre modèle expérimental l'immunodomination envers HY persiste chez des souris déficientes en perforine, d'autres mécanismes effecteurs doivent être impliqués dans l'immunodomination.

Mots Clés : Immunodomination, Lymphocyte T Cytotoxique, Expansion Clonale, Activation Cellulaire, Tétramères CMH-I.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Table des Matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations.....	viii
Dédicace.....	ix
Remerciements.....	x

Première Partie : INTRODUCTION

INTRODUCTION.....	2
-------------------	---

CHAPITRE I :

Résumé de la reconnaissance

antigénique par les lymphocytes T CD8⁺	3
--	---

1.1 Les Lymphocytes T CD8⁺	4
--	---

1.1.1 Le Récepteur de cellule T.....	4
--------------------------------------	---

1.1.2 L'Expansion Clonale.....	4
--------------------------------	---

1.1.3 Les Fonctions Effectrices.....	5
--------------------------------------	---

1.2 Les Antigènes et leur Présentation	6
---	---

1.2.1 Le Complexe Majeur d'histocompatibilité de Classe-I.....	6
--	---

CHAPITRE II :

Les Mécanismes

de l'Immunodominance	7
-----------------------------------	---

2.1 Introduction à l'immunodominance	8
---	---

2.1.1 Définition de l'Immunodominance.....	8
--	---

2.1.2. Conséquences de l'immunodominance.....	8
---	---

2.2	Les Antigènes Mineurs d'Histocompatibilité.....	10
2.2.1	Les AgMiHs B6 ^{dom1} et HY.....	10
2.3	Bases Cellulaires de l'immunodominance.....	12
2.3.1	Direction de la Réponse.....	12
2.3.2	Le Modèle de Compétition.....	14
2.4	Bases Moléculaires de l'immunodominance.....	15
2.4.1	Influence de la structure, séquence et nature de l'épitope.....	15
2.4.2	Influence de la densité de l'épitope.....	15
2.4.3	Influence de l'interaction.....	16
2.5	Limites des Études Antérieures.....	18

CHAPITRE III :

Les Tétramères de

Complexes Majeurs d'Histocompatibilité.....

3.1	Historique des Tétramères.....	20
3.1.1.	Les Premières Armes.....	20
3.1.2.	Sur la voie de la solution.....	20
3.2	Biochimie des Tétramères de CMH-I.....	22
3.2.1.	La Formation du complexe CMH-I/peptide.....	23
3.2.2.	L'Assemblage Moléculaire.....	23
3.2.3.	Tétramères de CMH de classe-II.....	25
3.3	Mécanismes Fonctionnels des Tétramères.....	26
3.3.1.	Facteurs Influençant le Marquage.....	26
3.3.2.	Avantages et Limites des Tétramères.....	28
3.4	Les Tétramères et l'Immunodominance.....	29

Deuxième Partie : ARTICLE

IMMUNODOMINATION RESULTS FROM FUNCTIONAL DIFFERENCES BETWEEN COMPETING CTLs	31
--	----

Troisième Partie : DISCUSSION

DISCUSSION	60
Essence des résultats.....	60
Prolifération vs Fonction.....	61
Implication de la compétition.....	62
La Fonction effectrice.....	63
Conclusion.....	65
Perspectives Futures.....	67
 RÉFÉRENCES	 68
 ANNEXE	 81
Article publié dans « European Journal of Immunology »	

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1 :** Réponses aux AgMiHs dominants et non-dominants. (p.13)
(Figure modifiée d'après la Figure 1, réf. 27)
- FIGURE 2 :** Le modèle de compétition. (p.14)
(Figure modifiée d'après la Figure 7.1b, ref. 41)
- FIGURE 3 :** La densité des épitopes dominants et non-dominants présentés. (p.17)
(Figure modifiée d'après la Figure 7.1a, réf. 41)
- FIGURE 4 :** Représentation schématique de tétramères de CMH-I. (p.22)
(Figure modifiée d'après la Figure 1, réf. Rev B)
- FIGURE 5 :** Les différentes étapes de synthèse des tétramères de CMH-I. (p.24)
- FIGURE 6 :** Méthode de marquage par tétramères de CMH-I. (p.27)
- FIGURE 7 :** Résumé schématique du modèle d'immunodomination avec ressources limitées. (p.64)

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Ag	Antigène
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
AgMiH	Antigène Mineur d'Histocompatibilité
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
TCR	Récepteur de Cellules T, « T-Cell Receptor »
IFN-γ	Interféron-gamma
TNF	Facteur de Nécrose Tumorale, « Tumor Necrosis Factor »
GVHD	Maladie du greffon contre l'hôte, « Graft-vs-host disease »
GVL	Réaction de greffon contre la leucémie, « Graft-vs-Leukemia »
CTL	Cellule T Cytotoxique, « Cytotoxic T Lymphocyte »
LDA	Test de Dilution Limite, « Limit Dilution Assay »
IL-2	Interleukine 2
TAP	Transporteur associé à l'apprêtement des antigènes, « Transporter associated with antigens processing »

*À mon père
J'étais et je resterai toujours fier de toi*

Benoit Proulx 1947-2001

REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Claude Perreault pour m'avoir permis d'entreprendre mon stage de maîtrise parmi son équipe. J'aimerais aussi le remercier de m'avoir donné les moyens et l'opportunité de travailler sur le développement de la méthode si révolutionnaire que sont les tétramères. De plus, par ses nombreuses connaissances, ses conseils précieux, sa vaste expérience et sa grande sagesse, le Dr Perreault a grandement contribué à susciter en moi un intérêt grandissant pour la recherche en immunologie.

J'aimerais aussi remercier Dr Sylvie Brochu, assistante de recherche du Dr Perreault, pour ses nombreux conseils, mais surtout pour m'avoir encadré et initié au travail de recherche en laboratoire.

Enfin, j'aimerais remercier Marie-Christine Meunier, Anne-Marie Lanteigne et Sylvie Brochu pour avoir participé à cette étude et contribué à son succès.

PREMIÈRE PARTIE
INTRODUCTION

INTRODUCTION

Remarquable mécanisme de défense, le système immunitaire adaptatif s'est développé chez les vertébrés à mâchoire au cours de l'évolution¹. Sous la pression des pathogènes qui nous entourent, ce système a co-évolué et a réussi de façon incroyable à adapter chacune de ses composantes, fonctions et mécanismes pour assurer la survie de l'hôte. Avec une force remarquablement bien équilibrée entre la destruction des intrus et l'absence de dommage au soi, le côté adaptatif de ce système reste certainement une arme d'une grande efficacité.

Principalement régi par les lymphocytes, le côté adaptatif du système immunitaire démontre bien les capacités destructrices considérables de notre système de défense physiologique. L'éradication massive des pathogènes présente toutefois des risques d'autodestruction, d'où l'importance d'un équilibre optimal entre une grande efficacité d'action et la réduction maximale des risques. À la base de la réponse immune, la reconnaissance antigénique a suscité nombre de recherches qui ont permis d'observer un phénomène particulier appelé immunodominance et qui démontre bien à quel point les stratégies évolutives de notre système visent la performance maximale, mais avec une prudence exemplaire.

Les travaux décrits dans ce mémoire permettent de mieux comprendre les mécanismes de l'immunodomination, phénomène crucial dans la détermination du répertoire des réponses immunes T CD8⁺.

Chapitre I

**Résumé de la reconnaissance antigénique
par les lymphocytes T CD8⁺**

1.1 Les Lymphocytes T CD8+

Représentantes majeures de l'immunité adaptative, les cellules T CD8⁺ contribuent à la résistance contre les pathogènes intracellulaires. Leur capacité à tuer les cellules infectées et à générer une grande variété de mécanismes effecteurs de défense leur confère un important potentiel de protection. Originaires des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, ils se différencient dans le thymus suite à une sélection positive, puis négative. Recirculant constamment des organes lymphoïdes au sang, les cellules T, n'ayant jamais rencontré d'antigènes (Ag), sont alors considérées comme naïves².

1.1.1 Le Récepteur de cellule T

Criblant littéralement la surface des lymphocytes T, les récepteurs de cellule T (TCR, « T-Cell Receptor ») sont des hétérodimères composés d'une chaîne α et d'une chaîne β liées ensemble par un pont disulfure et associées aux 6 chaînes transmembranaires CD3 ayant comme fonction la transmission intracellulaire du signal de reconnaissance^{3,4}. L'activation d'une cellule T est déterminée par l'interaction spécifique de ses TCRs avec son ligand : un peptide associé à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA). Lors de la rencontre initiale d'un TCR spécifique à son ligand, la cellule T naïve peut être activée et ainsi mener au développement d'une réponse dite primaire, dont l'amplitude est généralement relative à l'immunogénicité de l'Ag présenté^{5,6}.

1.1.2 L'Expansion clonale

L'activation se caractérisant d'abord par une expansion clonale des T spécifiques, le niveau des T CD8⁺ reconnaissant un épitope donné peut alors passer d'indélectable à près de 2% des CD8⁺ spléniques pour certains Ag bactériens⁷, et peut même atteindre les 50% dans le cas de certains virus, beaucoup plus immunogènes⁸. L'amplitude de l'expansion de CD8⁺ atteint généralement un maximum après 7-15 jours, puis diminue tranquillement pour atteindre un niveau inférieur à 5% de l'expansion initiale⁸. Ces cellules T CD8⁺ dites alors « mémoires » peuvent rester

présentes pour la vie de l'hôte et sont en mesure de répondre rapidement à la réapparition de l'Ag en question.

1.1.3 Les Fonctions Effectrices

L'expansion clonale terminée, les CD8⁺ peuvent alors élaborer une réponse dite effectrice à différents niveaux, comme la libération de cytokines incluant l'Interféron-gamma (IFN- γ), le facteur de nécrose tumorale (TNF, «Tumor Necrosis Factor») ainsi que certaines chemokines programmées pour le recrutement et l'activation d'autres systèmes de défense⁶. La fonction fondamentale des T CD8⁺ activés est toutefois leur capacité à induire la cytolysé des CPAs cibles, ce qui leur vaut la dénomination de cytotoxique («Cytotoxic T Lymphocyte», CTL). Régulée par deux grandes voies moléculaires, la lyse peut être effectuée par la voie perforine/granzyme qui produit des pores dans la membrane cellulaire et l'apoptose, ou encore par la voie Fas/Fas-ligand (Fas-FasL ou CD95L), qui induit la mort cellulaire programmée^{9,10,11,12}. Les mécanismes effecteurs peuvent aussi être accompagnés de différences d'expression de molécules de surface. En effet, associée aux glycoprotéines de surface CD43 et CD45RB, l'augmentation de l'expression de O-glycan est corrélée avec l'activation des fonctions effectrices. La quantification de son expression permet ainsi de différencier les T activés des cellules T naïves ou mémoires^{13,14,15}.

Toutefois aucune étude n'a jusqu'ici démontrée une corrélation directe entre l'augmentation de l'expression du O-glycan et la densité des ligands à la surface des CPAs^{13,14,15}.

1.2 Les Antigènes et leur présentation

Les différents pathogènes qui traversent les barrières naturelles de l'organisme ne sont pas instantanément reconnus par les lymphocytes T CD8⁺. En effet, ce n'est que suite à la pénétration cellulaire que les protéines provenant de pathogènes et se retrouvant dans le cytosol seront « apprêtées » par le protéasome, puis transportées dans le réticulum endoplasmique (RE) par le transporteur TAP. Une fois dans le RE, les peptides de 8 à 10 acides aminés se lieront de façon non-covalente mais stable, dans la niche peptidique formée par la molécule du CMH de classe I^{16,17}.

1.2.1 Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe-I

Retrouvé chez l'ensemble des cellules nucléées, les molécules du CMH-I sont composées d'une chaîne lourde transmembranaire et d'une chaîne légère, la bêta-2-microglobuline (β 2m). Une fois formé, le complexe protéique s'évade du RE et migre à la surface cellulaire où, ancré par la portion transmembranaire de la chaîne lourde, il présente un peptide au monde extracellulaire. À ce moment seulement, l'épitope pourra être reconnu par le TCR complémentaire¹⁸. Sans la chaîne légère ou le peptide, la chaîne lourde du CMH-I est rétrotransloquée dans le cytosol, puis dégradée par le protéasome¹⁹.

Comme les CPAs présentent à leur surface plusieurs épitopes à la fois par différentes molécules du CMH, l'activation et l'expansion d'une diversité proportionnelle de clones T spécifiques devrait être par conséquent observée. Toutefois, la réponse T cytotoxique n'est souvent observée que contre un seul ou très peu d'épitopes^{20,21,22}.

Chapitre II

Les Mécanismes de l'Immunodominance

2.1 Introduction à l'Immunodominance

Malgré la présence simultanée de plusieurs épitopes immunogènes adéquatement présentés, seul un nombre réduit de clones T spécifiques s'activeront, se multiplieront et développeront leurs fonctions effectrices suite à la reconnaissance antigénique. En effet, suite à des études sur les antigènes mineurs d'histocompatibilité (AgMiH), c'est avec surprise qu'il fut observé que la réponse des T cytotoxiques n'était dirigée qu'envers un nombre très restreint d'épitopes. Cette restriction du répertoire des réponses lymphocytaires T est connue sous l'appellation « d'immunodominance ». Ce phénomène a aussi été observé dans les réponses aux Ags viraux, bactériens et tumoraux^{22,23,24,25}.

2.1.1 Définition de l'Immunodominance

Cet effet se définit par une orientation préférentielle de la réponse T envers un ou très peu d'Ags, dits « dominants » en négligeant les autres, dits « non-dominants » ou « cryptiques », qui n'entraîneront alors qu'une réponse faible à indétectable. L'orientation préférentielle de la réponse repose principalement sur le fait que plusieurs épitopes co-présentés sont non-immunogènes. Toutefois l'inhibition de la reconnaissance d'épitopes immunogènes par un ou plusieurs autres est décrite par *l'immunodomination*. Cette observation initiale de l'immunodominance est définie par la suppression de la réponse envers un épitope non-dominant par un épitope dominant^{26,27,28,29}.

L'habileté d'un Ag à en dominer un autre (ou être dominé) est toutefois relative. En effet, un déterminant qui en domine un second peut être dominé par un troisième et ainsi de suite, permettant ainsi d'observer une certaine hiérarchie de dominance parmi les Ags^{22,23}.

2.1.2 Conséquences de l'Immunodominance

L'immunodominance a pour principale conséquence de restreindre la diversité du répertoire de clones T spécifiques impliqués dans la réponse immunitaire. À première vue, cette restriction du répertoire envers un nombre limité d'antigènes peut paraître risquée puisqu'elle implique « l'ignorance » de plusieurs épitopes de pathogènes. Mais

le risque majeur provient sûrement du fait que de focaliser la réponse à un nombre très limité d'épitope augmente considérablement le risque « d'évasion immune », phénomène par lequel un épitope cesse d'être présenté. Dans le cas d'infections virales, bactériennes ou de cellules tumorales en développement, les conséquences peuvent devenir défavorables pour l'hôte^{30,31,32}.

Il devient alors impératif de comprendre les mécanismes qui régissent l'immunodominance et l'immunodomination, et qui entraînent une telle restriction de la diversité de la réponse. Cette compréhension pourrait permettre de meilleures prédictions sur l'issue de la réponse ou, même encore, un meilleur maniement de la réponse, principe fondamental dans l'élaboration de vaccins efficaces.

2.2 Les Antigènes Mineurs d'Histocompatibilité

Immunogènes et ayant le potentiel d'entraîner des réactions de rejet de greffe ou de maladie de greffon contre l'hôte (« graft-vs-host disease », GVHD), certains AgMiHs sont depuis longtemps des éléments majeurs de l'étude de l'immunodominance^{25,26,27}. Ces peptides du soi, principalement associés au CMH-I, proviennent de la protéolyse partielle de protéines endogènes. Leur polymorphisme provient de rares mutations chez des protéines du soi évolutivement conservées, leur conférant ainsi leurs propriétés immunogènes lors de transplantation^{33,34,35}. Même si les possibilités de mutation peuvent mener à une quantité faramineuse de nouveaux peptides mineurs, une très faible proportion du polymorphisme est immunogène^{36,37}.

2.2.1 Les AgMiHs B6^{dom1} et HY

Parmi ces AgMiHs, B6^{dom1} et HY ont depuis longtemps été d'importants éléments de l'étude de l'immunodominance^{26,27}. B6^{dom1} est un nonapeptide (AAPDNRETF) codé par le locus H7 de la partie terminale télomérique du chromosome 9 chez la souris. De plus, B6^{dom1} provient de la famille de mineurs B6^{dom} composée de 10 épitopes dominants retrouvés chez les souris C57BL/6^{38,39,40}. Présenté par le CMH-I murin D^b, le nombre de copie du complexe CMH-I/peptide retrouvé à la surface de splénocytes de souris C57BL/6 est près de 1000 copies/cellule faisant de B6^{dom1} un des épitope les plus abondants parmi ceux associés aux molécules de classe-I^{38,41,42}.

Le second nonapeptide, HY (WMHHNMDLI), est quant à lui codé par le gène *Uty* retrouvé sur le chromosome Y^{43,92}. Il fut à l'origine découvert comme un Ag de transplantation et les recherches effectuées sur les gènes Ir, suite à l'isolement de clones T répondant aux différents épitopes, ont mené à la production de la première souris « TCR transgénique »^{43,44}. Également présenté par D^b, HY n'est toutefois présent qu'en faible quantité à la surface des CPA (10 copies/cellule)³⁸.

Dans la hiérarchie de l'immunodominance, B6^{dom1} et HY sont littéralement positionnés aux extrêmes, B6^{dom1} étant le déterminant dominant et HY, le non-dominant.

Ce dernier peut entraîner une réponse T CD8⁺ cytotoxique lorsque présenté seul (c'est-à-dire que la compatibilité ne diffère que par un seul antigène), mais la réponse disparaît lorsque HY est présenté avec d'autres AgMiHs⁴¹.

Au contraire, dans plusieurs combinaisons, B6^{dom1} est toujours dominant, c'est-à-dire qu'il induit toujours une réponse CD8⁺ cytotoxique et ce même lorsqu'il est présenté simultanément avec une centaine d'autres AgMiHs²⁶.

Utilisés comme modèle dans cette étude, ces AgMiHs ont fait l'objet de caractérisations au niveau de leur densité de présentation à la surface de différentes CPAs mais aussi au niveau de leur distribution tissulaire. Malgré le fait que certaines populations restent encore à caractériser, les AgMiHs HY et B6^{dom1} se présentent jusqu'à maintenant dans des rapports similaires^{26,38,39,41,42,93}.

Tous deux présentés par la même molécule de classe-I (D^b), étant aux opposés de l'échelle de l'immunodominance et leur séquence étant respectivement connue, B6^{dom1} et HY sont chez la souris des candidats idéals à l'étude de l'immunodominance.

2.3 Bases Cellulaires de l'Immunodominance

La présentation simultanée de plusieurs épitopes immunogènes à la surface d'une CPA pourrait théoriquement mener à l'activation des T CD8⁺ spécifiques à tous ces épitopes. Il serait possible alors d'observer une réponse T extrêmement hétérogène qui ciblerait tous les épitopes immunogènes du microbe. Hors, la réalité est différente.

2.3.1 Direction de la réponse

Comme mentionné précédemment, l'effet d'immunodominance implique une réponse préférentielle contre un épitope plutôt qu'un autre. Ce principe n'est valable toutefois que lorsque les épitopes sont présentés simultanément. Lorsque présenté seul, le non-dominant HY induit avec facilité une réponse cytotoxique similaire à B6^{dom1}. Même lorsque présenté sur des CPAs différentes, l'induction d'une réponse cytotoxique reste toujours possible. Toutefois, la coprésentation de B6^{dom1} et HY sur une même CPA ne permet que d'observer une réponse contre B6^{dom1} (Figure 1), suggérant ainsi que l'immunodomination résulte d'un phénomène de compétition de la surface des CPAs entre les clones T spécifiques au dominant B6^{dom1} et au non-dominant HY^{26,27,38}.

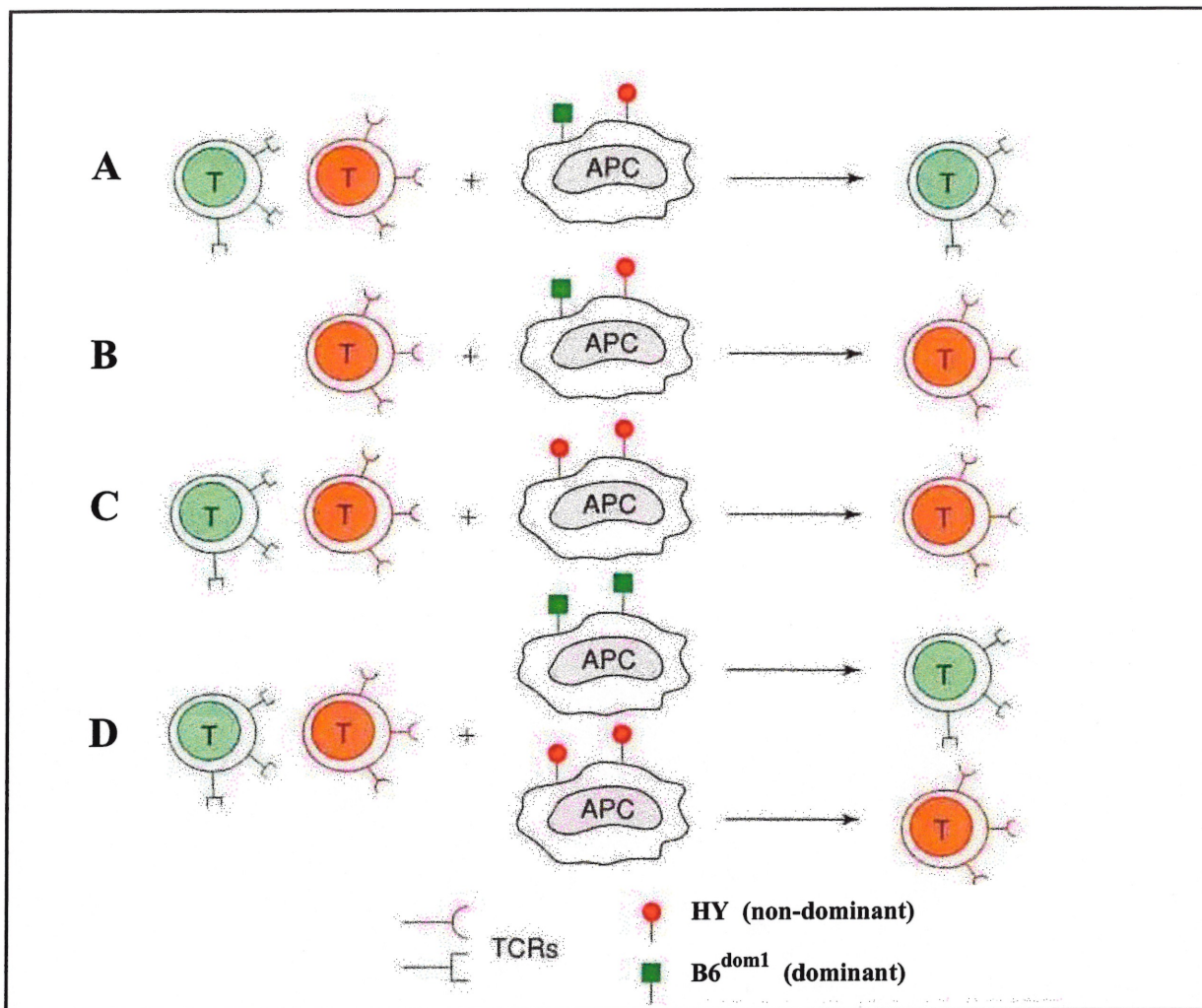


Figure 1 : *Réponses aux AgMiHs dominants et non-dominants. Lorsque l'AgMiH $B6^{dom1}$ et HY sont présents simultanément sur la même CPA, seules les cellules T $CD8^+$ reconnaissantes le dominant $B6^{dom1}$ proliféreront (A) . Toutefois, il n'est possible d'observer une réponse cytotoxique contre l'AgMiH non-dominant HY que lorsque ce dernier est présenté seul (B) ou lors de l'absence de cellules T spécifiques à $B6^{dom1}$ (C) ou encore lorsque les deux Ags sont présentés sur des CPAs différentes (D).*
(Figure modifiée d'après la Figure 1, réf. 27)

2.3.2 *Le Modèle de Compétition*

Le fait qu'un « compétiteur » gagne le privilège de se développer en CTL pourrait être influencé par deux paramètres de la réponse lymphocytaire, soit : la vitesse d'expansion clonale, et le nombre de clones de départ ^{27,38}.

La quantité initiale de clones prêts à répondre est associée à la nature et la diversité du répertoire naïf, ainsi qu'à la présence de cellules T mémoires. Les cellules mémoires, résiduelles de la réponse primaire, sont généralement retrouvées en nombre supérieur aux cellules T matures naïves, mais leur influence dans les mécanismes d'immunodomination, malgré quelques études, reste encore très peu décrit⁴⁵. En ce qui concerne la nature et la diversité du répertoire, il est néanmoins admis que les variations et différences interindividuelles sont susceptibles d'influencer l'immunodominance ^{22,46}.

L'expansion clonale est quant à elle un élément important pouvant mener au surnombre de T spécifiques à un des épitopes présentés par rapport à un autre. Ce surnombre peut par conséquent favoriser considérablement la compétition pour les CPAs (Figure 2).

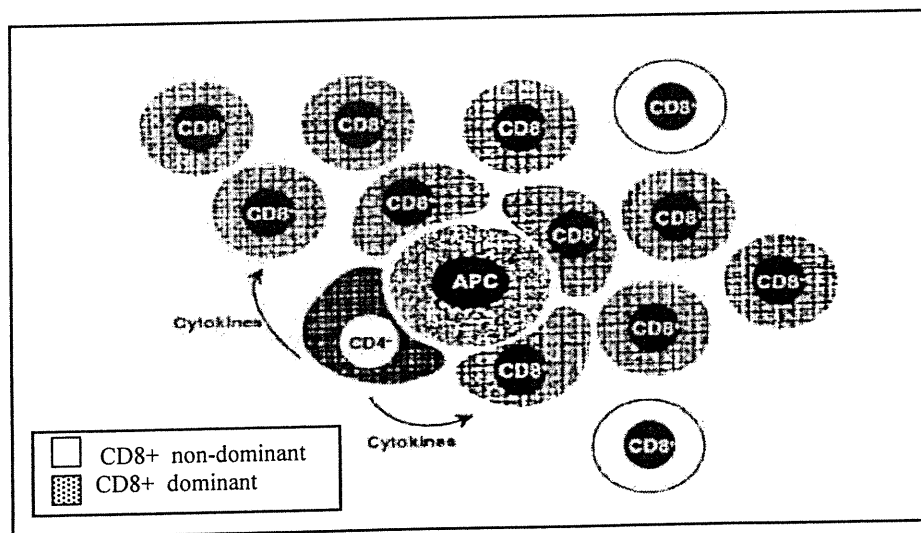


Figure 2 : *Le modèle de compétition.* Un nombre plus important de clones T contre un épitope dominant leur permet de compétitionner plus efficacement pour les ressources que sont les CPAs. (Figure modifiée d'après la Figure 7.1b, réf. 41)

2.4 Bases Moléculaires de l'Immunodominance

Il est important de comprendre que l'immunodominance est le résultat d'un ensemble de mécanismes et de paramètres associés à la reconnaissance antigénique et dont les bases premières et fondamentales se retrouvent aussi au niveau moléculaire. Cette histoire commence donc au cœur même de la CPA, au niveau même des protéines.

2.4.1 Influence de la structure, séquence et nature de l'épitope

Comme mentionné un peu plus tôt, la destruction protéique par le protéasome est un élément important dans la génération des peptides pour la formation, dans le RE, du complexe trimoléculaire qu'est le CMH-I. Plusieurs études ont démontré que la séquence protéique originelle, la machinerie protéolytique et les mécanismes de transport jouent des rôles majeurs dans la génération de peptides dits « adéquats », pour la formation du complexe^{47,48,49}. Suite à son apprêtement, le peptide adéquat possède une séquence qui aura une affinité suffisante pour se lier de façon stable dans la niche peptidique de la chaîne lourde et maintenir l'intégrité du complexe⁵⁰. Cette affinité, en plus de contribuer au taux de formation du complexe, contribue aussi à sa stabilité à la surface cellulaire et, par conséquent, influence le taux de présentation²².

2.4.2 Influence de la densité de l'épitope

Le taux de formation du complexe CMH/peptide est un élément important et déterminant dans la présentation du peptide^{38,50}. Ainsi, plusieurs études ont démontré que la densité d'un complexe CMH/peptide à la surface d'une CPA est un élément clé de la reconnaissance antigénique pouvant moduler l'activation des cellules T CD8⁺. En effet, le nombre de copies d'une combinaison CMH-I/peptide donnée est un élément souvent associé à la modulation de l'activité cytotoxique des cellules T CD8⁺⁵¹. De plus, le nombre d'interactions TCR-CMH-I/peptide est directement fonction du nombre de complexes présentés^{52,53}. Ce nombre d'interactions étant important dans la formation du signal menant à l'activation, la densité de l'épitope présentée est ainsi directement reliée à l'activation des cellules T CD8⁺^{52,53}.

2.4.3 Influence de l'Interaction

Pour qu'un signal transmis par le TCR entraîne une cascade intracellulaire menant à l'activation, le TCR doit interagir de façon à recevoir plusieurs « déclenchements en série » de la part de son ligand spécifique, mieux connus sous le terme de « serial triggering ». L'intensité de ces déclenchements ainsi que leur nombre contribuent à la formation du signal menant à l'activation⁵².

Le nombre de déclenchements étant favorisé par une densité élevée de complexes CMH-I/peptide à la surface, il reste que l'affinité du TCR pour son ligand joue un rôle prépondérant dans le nombre de déclenchements. En effet, les travaux de Lanzavecchia et Valitutti suggèrent l'hypothèse par laquelle l'affinité optimale contribuant à la formation du signal ne correspond pas à l'affinité maximale, mais plutôt à une affinité dite intermédiaire qui mène à une vitesse de dissociation plus rapide du TCR et du complexe CMH-I/peptide. Ainsi, des ligands d'affinité optimale seraient en mesure d'interagir avec un plus grand nombre de TCRs lors de la rencontre, augmentant ainsi le nombre de déclenchements en série. Par contre, dans le cas de ligands d'affinité supérieure, une dissociation plus longue aurait pour effet de diminuer, pour un temps donné, le nombre d'interactions TCR-CMH-I/peptide et par le fait même le nombre de déclenchements en série^{52,53}.

Relatif à cette présente étude, il fut démontré pour le complexe B6^{dom1}/D^b que l'interaction avec le TCR était quasi optimale. En effet, l'affinité du TCR pour son complexe est intermédiaire, permettant aux TCR d'interagir avec un plus grand nombre de complexes (Figure 3). De plus, le nombre élevé de copie de B6^{dom1}/D^b à la surface des CPAs favorise le nombre potentiel de déclenchements en série.

Au contraire, le faible niveau de présentation de HY (Figure 3), ainsi que l'affinité d'interaction élevée du complexe CMH-I/peptide avec le TCR défavorise le nombre de déclenchement en série possible. Ainsi le complexe HY/D^b est moins efficace que B6^{dom1}/D^b à : 1) effectuer le « serial triggering », 2) interagir avec un nombre aussi élevé de TCRs, 3) provoquer une reconnaissance aussi performante par les cellules T CD8⁺.

Le nombre d'interactions est un élément moléculaire clé contribuant à la formation d'un signal d'activation efficace, dont l'intensité est en relation avec la force de la réponse⁵². Ainsi, une meilleure activation par un épitope plutôt qu'un autre peut avoir d'importantes conséquences sur le développement et le destin de la réponse.

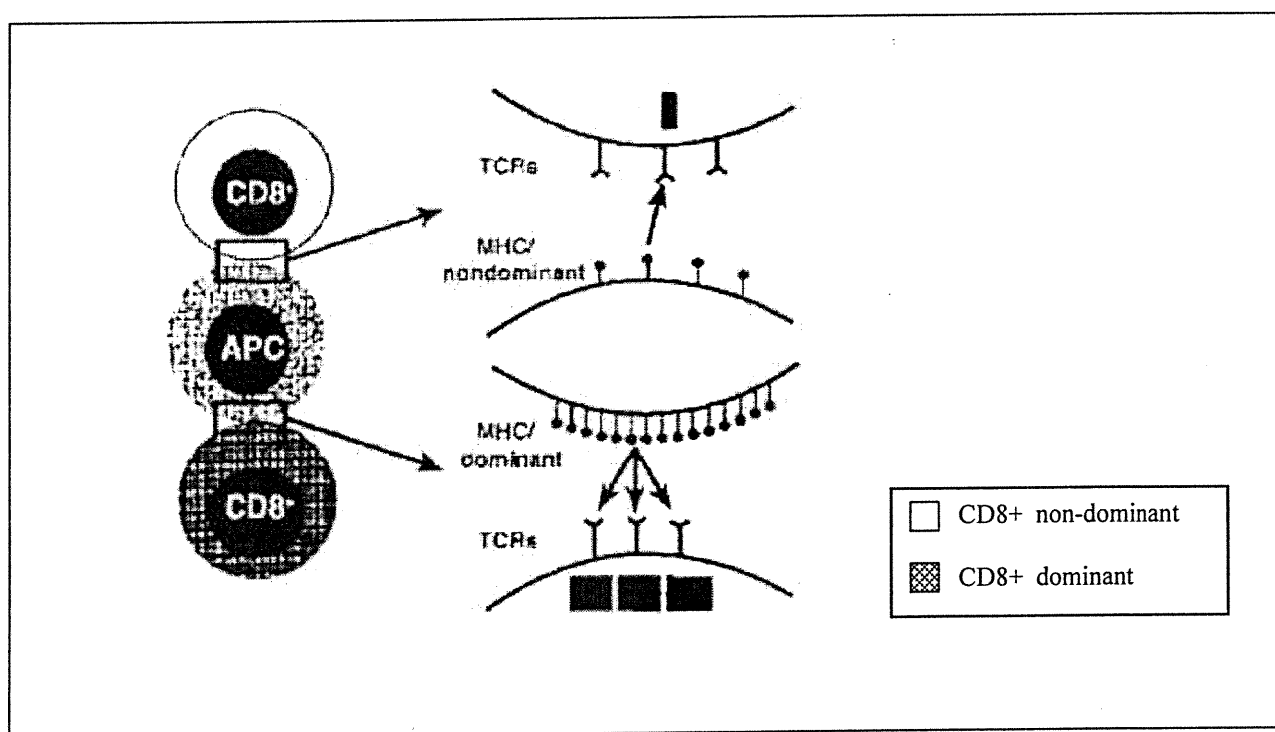


Figure 3 : La densité des épitopes dominants et non-dominants présentés. L'épitope $B6^{dom1}$ présenté par D^b est beaucoup plus efficace que HY pour activer les cellules $T CD8^+$, tout d'abord par le nombre de copies plus élevé à la surface qui permet d'engager un plus grand nombre de TCR, mais aussi par l'affinité optimale du complexe envers le TCR, plus modérée qu'avec HY et qui permet un nombre d'interactions possibles plus élevé. (Figure modifiée d'après la Figure 7.1 a, réf. 41)

2.5 Limites des Études Antérieures

Les études réalisées précédemment démontrant l'immunodomination des CTL envers B6^{dom1} sur HY étaient basées sur des tests de cytotoxicité²⁶. Toutefois, la mesure des niveaux d'activité cytotoxique ne permet pas d'affirmer si l'immunodomination observée prévient l'expansion des cellules T spécifiques à l'épitope non-dominant HY ou si elle prévient le développement de leur caractère cytotoxique.

En effet, des études démontrent que certaines présentations antigéniques mènent à l'expansion des cellules T CD8⁺ qui ne présentent pas de fonctions effectrices ou qui produisent des cytokines comme l'IFN- γ et l'IL-2 sans toutefois être cytotoxiques. L'activation *in vitro* de cellules T peut entraîner plusieurs niveaux d'activation effectrice^{54,55}. Cette hiérarchie d'activation a été établie pour différentes fonctions. L'activation de cellules T naïves menant à la fonction effectrice cytotoxique médiée par la perforine reste le niveau le plus stringent et difficile à acquérir. Cette fonction n'est générée que par un signal TCR fort et optimal^{55,56,57,58}.

La question de base de notre étude étant de déterminer si la reconnaissance de B6^{dom1} inhibait l'expansion (vs l'acquisition de la fonction cytotoxique) des T anti-HY, nous avons estimé que la méthode la plus appropriée pour étudier la cinétique de la réponse contre ces antigènes était l'utilisation de tétramères CMH-I.

Chapitre III

Les Tétramères de Complexes Majeurs d'Histocompatibilité

3.1 Historique des Tétramères

L'étude de l'immunité adaptative, si prolifique fût-elle dans le cas des lymphocytes B⁵⁹, a depuis longtemps été plus ardue chez les lymphocytes T. En effet, depuis les tous premiers temps que les lymphocytes T ont été identifiés, plusieurs travaux ont porté sur l'identification et la quantification des cellules T spécifiques à un antigène.

3.1.1 Les Premières Armes

Le seul élément pouvant différencier les lymphocytes T les uns des autres étant la combinaison de leur TCR, quelques techniques de niveau cellulaire furent développées, comme celle de dilution limite (« Limit Dilution Assay », LDA). Mais cette méthode *in vitro*, indirecte et approximative, n'est basée que sur l'activité lytique et ne détecte qu'une fraction des cellules T générées⁶⁰. De plus, si les conditions de restimulations et de prolifération *in vitro* sont suboptimales, il y a de bonnes chances qu'une réponse faible à un déterminant ne soit pas détectée.

D'autres techniques basées sur la production de cytokines furent aussi développées, comme l'« Enzyme Link ImmunoSpot Assay » (ELISPOT) et le marquage des cytokines intracellulaires. Malgré leur haute sensibilité, ces techniques dépendent principalement de la période de production des cytokines ciblées et ont tendance à sous-estimer le nombre total de T spécifiques⁶¹.

Puis, à un niveau plus moléculaire, certains investigateurs ont développé des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement certains TCRs^{62,63}. Toutefois, cette approche demande la préparation parfois très difficile d'anticorps monoclonaux hautement spécifiques et peut donner lieu à des réactivités croisées^{64,65}.

3.1.2 Sur la Voie de la Solution

Suite à l'assemblage moléculaire du CMH de classe I avec un peptide choisi, certains ont essayé sans succès de marquer des T CD8⁺ avec le complexe soluble^{66,67}. C'est alors qu'au début des années 90, les recherches, entre autres de Mark Davis et McHeyzer-Williams ont permis de comprendre les raisons fondamentales des échecs de

l'utilisation de monomères de CMH-I solubles. En effet, la découverte que l'interaction TCR-CMH était régie par une faible affinité et un taux de dissociation rapide permettait alors de conclure que ces facteurs nuisaient considérablement au marquage stable de cellules T CD8⁺ avec des monomères de CMH-I^{52,68,69}.

Puis, l'idée de multimériser le complexe CMH-I/peptide pour augmenter son avidité pour les TCRs fut réalisée tout d'abord avec le complexe I-E^k associé à un peptide du cytochrome c⁷⁰. Enfin, en 96, Mark Davis et son étudiant post-doctoral, John Altman appliquèrent cette technique au complexe HLA pour former ainsi des tétramères de CMH-I. Ce multimère devait alors avoir un taux de dissociation plus lent et permettre une bien meilleure stabilité de marquage⁷¹.

3.2 Biochimie des Tétramères de CMH-I

Facile d'utilisation, il n'en reste pas moins que la préparation de tétramères est une tâche plutôt complexe et délicate. Véritable construction moléculaire (Figure 4), cet assemblage nécessite l'utilisation de plusieurs notions et techniques biochimiques diverses.

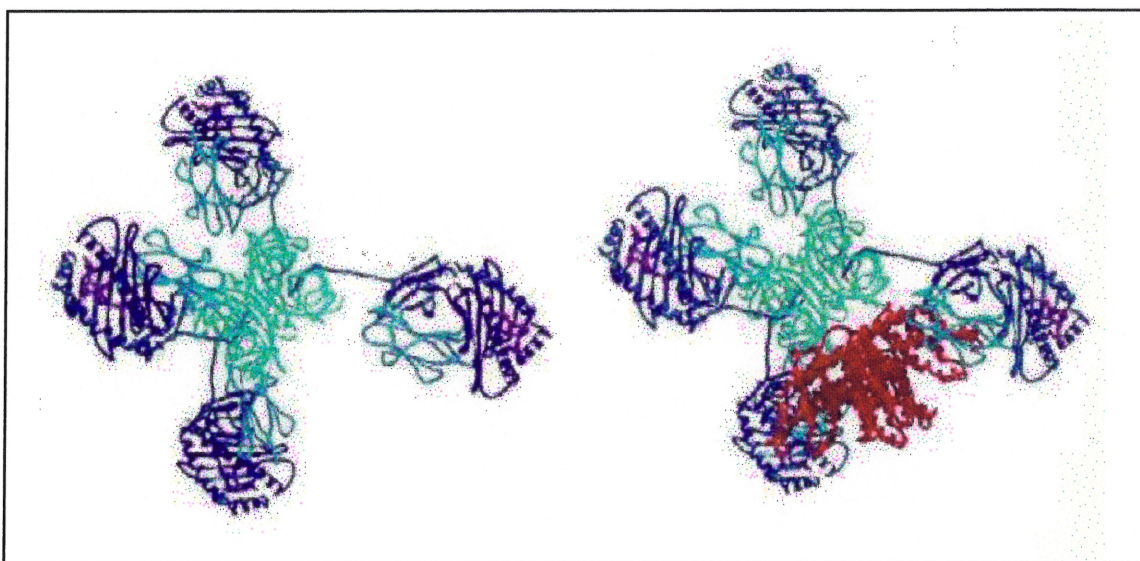


Figure 4 : *Représentation schématique de tétramères de CMH-I. En mauve, chaque peptide est retrouvé dans la niche peptidique de la chaîne lourde (bleu foncé), cette dernière étant associée à la β_2m (bleu). Les CMH-I sont associés à la streptavidine (turquoise) elle-même couplée à un fluorochrome, dans ce cas ci, la phycoérythrine (PE) (rouge). (Figure modifiée d'après la Figure 1 , réf. 72)*

3.2.1 La Formation du Complexe CMH-I / peptide

Le complexe CMH-I/peptide est l'élément clé des tétramères. La préparation initiale du classe I fut décrite par Garboczi⁶⁶ et est basée sur l'utilisation de vecteurs d'expression protéique comportant la séquence de la chaîne lourde du complexe ou de la chaîne légère, la β_2m . La séquence de la chaîne lourde diffère de la séquence d'origine par le fait qu'elle possède, à la fin de la portion terminale COOH, une séquence codante pour le substrat enzymatique de la biotine ligase. Une fois les vecteurs introduits chez *Echerichia coli*, les chaînes sont surexprimées sous forme de corps d'inclusions (Figure5). Ces agrégats de protéines insolubles sont purifiés puis solubilisés dans une forte concentration de dénaturant. La reconformation moléculaire native du complexe CMH-I/peptide est effectuée par une méthode de dilution, dans laquelle l'agent dénaturant est dilué dans un tampon propice à la reconformation, libérant ainsi les chaînes solubilisées. En présence d'agents favorisant les mécanismes de reconformation, les deux chaînes s'assemblent, incorporant simultanément le peptide choisi et présent en solution (Figure5). Une fois la solution de reconformation concentrée, le complexe est séparé selon sa charge ionique par colonne échangeuse d'ions.

Comme la reconformation du complexe exige obligatoirement la présence stable du peptide dans la niche^{19,66} un complexe stable nécessite la présence de la chaîne lourde, de la chaîne légère et le peptide, tous harmonieusement assemblés. Le rendement final de reconformation variant de 10 à 20% dépend principalement de l'affinité et de la stabilité du peptide pour le classe I.

3.2.2 L'Assemblage Moléculaire

Le complexe produit est par la suite enzymatiquement biotinylé à sa séquence substrat, par l'enzyme biotine ligase : Bir A (Figure 5). Très sensible, cette réaction permet généralement un rendement de biotinylation de 60 à 80% pouvant être évalué par test de migration retenue (« band shift assay ») ou par ELISA. L'excès de biotine libre retiré, le complexe biotinylé est mis en présence de streptavidine couplée à un fluorochrome. Déjà conjugué à la streptavidine, le fluorochrome peut varier selon les besoins, mais la phycoérythrine (PE) est préférentiellement utilisée dû à la forte intensité de son signal d'émission. Comme la streptavidine possède quatre sites de couplage à la

biotine, l'assemblage de quatre complexes CMH-I/peptide forme le tétramère (Figure 5). La réaction de conjugaison est finalement passée sur un tamis moléculaire (ou gel de filtration) pour séparer, selon leur poids moléculaire, les véritables tétramères des trimères, dimères et autres éléments non-conjugués. Cette étape de conjugaison est généralement réalisée dans des ratios de CMH-I biotinylés/streptavidine-PE de 4:1 à 8:1, où un excès de complexe favorise la formation de tétramères, au lieu de trimères et dimères.

Très sensible à la congélation, les tétramères doivent être conservés à 4°C en présence d'inhibiteurs de protéases et d'excès de peptide jusqu'à leur utilisation.

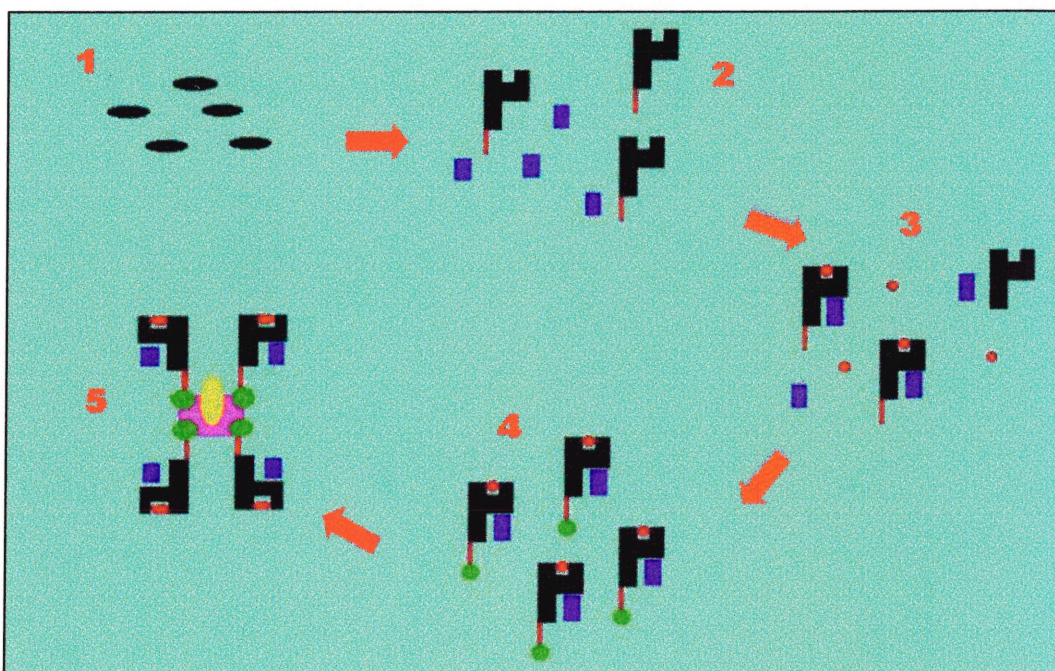


Figure 5 : *Les différentes étapes de synthèse des tétramères de CMH-I. Des systèmes d'expressions bactériens sont transformés avec des séquences codantes (1) pour les chaînes lourdes et légères ($\beta 2m$) qui sont par la suite exprimées (2). Puis, en conditions optimales, la reformation du complexe s'effectue en présence du peptide désiré (3). La séquence substrat de la chaîne lourde est biotinylée par une biotine ligase (4), et finalement le complexe biotinylé, et conjugué à la streptavidine elle-même conjuguée à un fluorochrome pour former un tétramère de complexe CMH-I/peptide.*

3.2.3 Tétramères de CMH de Classe-II

Dans quelques travaux, la technologie des tétramères fut appliquée aux CMH de classe II pour l'identification de lymphocytes T CD4⁺. Toutefois, il semble que le rendement de reformation soit dramatiquement plus faible, ce qui a incité des investigateurs à développer de nouvelles stratégies comme la formation de complexes CMH-II dont le peptide est génétiquement attaché à une section correspondant à la niche lors de l'expression des chaînes du classe II ⁷³. Cependant, même la tétramérisation du complexe serait parfois insuffisante à la stabilité de marquage à cause des interactions TCR-CMH classe II plus faibles que pour le classe I ⁷⁴.

3.3 Mécanismes Fonctionnels des Tétramères

L'avidité des tétramères pour les cellules T est suffisante pour en assurer le marquage. Même si les tétramères sont composés de quatre CMH-I, plusieurs éléments, dont la taille imposante de la PE (voir Figure 4), suggèrent que le marquage ne soit en fait que trimérique. Toutefois des études démontrent la baisse importante d'efficacité fonctionnelle chez les trimères⁷². Le marquage par tétramères est très similaire à celui pour les anticorps. En effet, la suspension cellulaire préparée est mise en présence de tétramères dans des conditions d'incubation préalablement déterminées. Puis les tétramères fixent les TCRs des cellules T spécifiques pour cette combinaison de CMH-I/peptide. L'identification et la quantification sont par la suite effectuées par cytométrie en flux (Figure 6).

3.3.1 Facteurs Influençant le Marquage

Comme les températures et temps d'incubation requis peuvent varier considérablement entre divers tétramères (différents peptides), les conditions doivent être préalablement étudiées. Plusieurs études ont par ailleurs démontré que la spécificité et l'intensité étaient souvent dépendantes de la température. Une plus forte intensité et une plus fine spécificité sont observées lors de marquage à des températures plus élevées que celles généralement utilisées avec les anticorps^{75,76}.

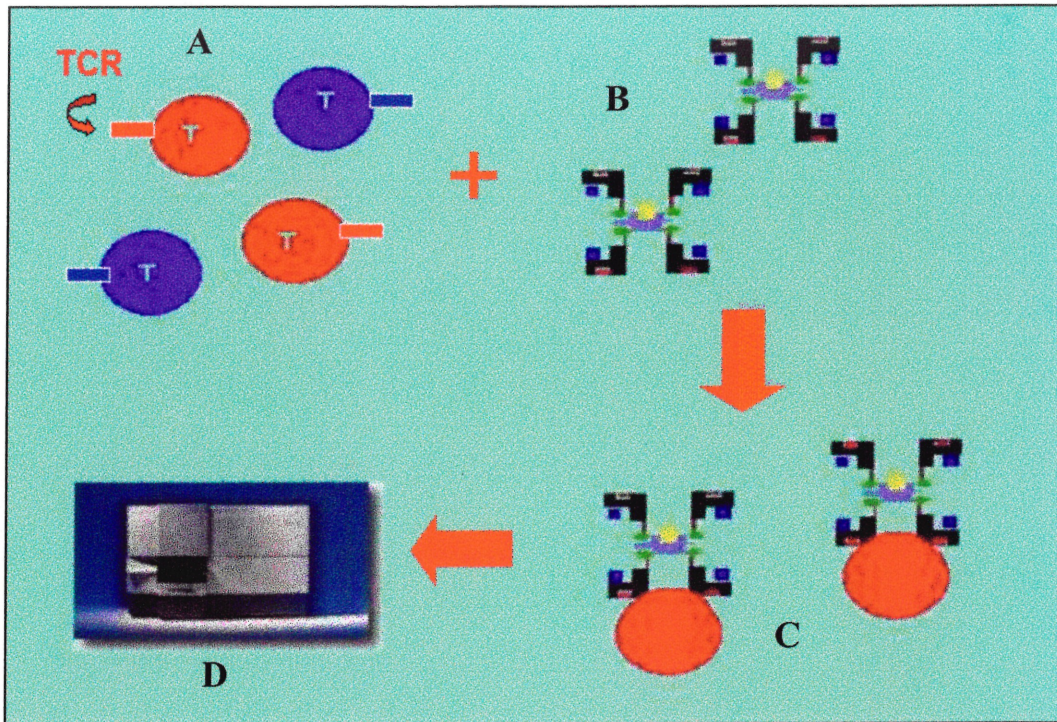


Figure 6 : *Méthode de marquage par tétramères de CMH-I.* Suite à la préparation de la solution cellulaire (e.g. splénocytes) (A), une concentration déterminée de tétramères est ajoutée aux cellules (B). Dans des conditions d'incubation optimales préalablement établies, les CMH-I/peptide des tétramères fixent les cellules T CD8⁺ spécifiques au peptide (C). Par le fluorochrome (PE) du tétramère, il est alors possible en cytométrie de flux d'identifier et de quantifier les T CD8⁺ (avec marquage du CD8) spécifiques (D).

L'augmentation de la température menant à un taux de dissociation plus rapide entre le TCR et le CMH-I a permis d'atteindre de très hauts niveaux de spécificité à 37°C en éliminant le marquage de cellules T possédant une réactivité croisée^{77,78}.

Fait particulièrement intéressant, l'internalisation des tétramères fut observée à 37°C, ce qui, semblerait-il, contribuerait à l'augmentation de l'intensité de marquage⁷⁸.

Combiné au marquage du CD8⁺, l'utilisation de la cytométrie de flux permet l'identification et la quantification des cellules spécifiques à l'Ag étudié. À la grande spécificité des tétramères est aussi ajoutée une forte sensibilité pouvant atteindre 1 dans 10,000⁷⁷. Les tétramères permettent ainsi l'identification et la quantification directe de cellules T CD8⁺ spécifiques, faisant de cette technique un outil idéal pour l'ensemble des études sur la réponse T spécifique.

3.3.2 Avantages et Limites des Tétramères

- Spécificité extrêmement élevée pour la reconnaissance du TCR correspondant.
- Très versatile : on peut utiliser n'importe quel peptide adéquat.
(de nature virale, tumorale, microbienne, AgMiH, etc.)
- Méthode directe et immédiate ne nécessitant pas de prolifération *in vitro* comme la technique de LDA.
- Beaucoup plus fiable et précis que la technique de LDA.
- N'implique pas la réactivité croisée observée avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux.
- Complémenté par la technique de cytométrie en flux, efficace, rapide et précise.

Une limite de cette méthode est la durée de vie des tétramères, limitée à quelques mois, due au relargage du peptide de sa niche provoquant ainsi la dissociation du complexe^{46,66,71,77}.

Une autre limite est que les tétramères ne permettent pas de distinguer nombre et fonction. Certaines cellules T détectées peuvent être non fonctionnelles. Aussi, une étude suggère la possibilité d'obtenir des cellules T faussement négatives avec les tétramères, possiblement due à une faible avidité⁵⁷.

Impliquant bon nombre d'étapes et de techniques, d'appareils et de matériel, la synthèse de tétramères fonctionnels reste une tâche délicate. En effet, de façon plus technique, la qualité des étapes, particulièrement celles au niveau de la purification

protéique, représente un important facteur de limitation qualitatif du marquage des tétramères.

De plus, les coûts souvent importants associés à leur synthèse sont principalement dus aux techniques (chromatographie) ainsi qu'aux réactifs, plus particulièrement les peptides.

3.4 Les Tétramères et l'Immunodominance

Compte tenu de ce qui précède, nous avons considéré que les tétramères constituaient l'outil de prédilection pour l'étude de l'immunodominance chez les AgMiHs. HY et B6^{dom1} se liant de façon stable au CMH-I murin D^b^{26,79}, la synthèse de tétramères est potentiellement réalisable.

On trouve dans l'article qui suit les études que nous avons faites pour démontrer l'efficacité des tétramères puis identifier les mécanismes d'immunodomination par lesquels l'antigène dominant B6^{dom1} prévient la réponse cytotoxique envers le non-dominant HY.

DEUXIÈME PARTIE
ARTICLE

**IMMUNODOMINATION RESULTS FROM FUNCTIONAL DIFFERENCES
BETWEEN COMPETING CTLs**

**Guillaume Roy-Proulx*, Marie-Christine Meunier*, Anne-Marie
Lanteigne*, Sylvie Brochu*, and Claude Perreault***

*Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal,
Quebec, Canada H1T 2M4

Key words: antigen-presenting cell, CD8⁺ T cell, immunodominance, major
histocompatibility complex tetramers.

Running foot: The mechanism of immunodomination.

ABSTRACT

The presence of dominant epitopes suppresses generation of CD8⁺ T cell cytotoxic activity towards other non-dominant immunogenic epitopes found on the same antigen-presenting cell (APC). This phenomenon, termed immunodomination, drastically restricts the diversity of the repertoire of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. We show that immunodomination abrogates expansion rather than differentiation of CTLs specific for non-dominant epitopes, and that it is regulated by the CTL/APC ratio. Furthermore, we demonstrate that the essence of immunodomination is the level of effector function of CTLs specific for the various epitopes, as assessed on the basis of cell surface expression of O-glycan epitopes and intracellular perforin content, rather than the number of these CTLs. Based on our results, we deduce that APCs are either rapidly eliminated or become exhausted upon interaction with CTLs specific for dominant epitopes. Thereby they are unable to prime CTLs that recognize non-dominant epitopes. We conclude that following antigen priming CTL populations of similar size can display important differences in effector function, and that these functional differences are instrumental in shaping the repertoire and in determining the outcome of CTL responses.

Abbreviation used in this paper: MiHA, minor histocompatibility antigen.

The functioning of the adaptive immune system found in jawed vertebrates has been shaped by 450 million years of co-evolution with pathogens (1, 2). Recognition of MHC class I/peptide complexes by CD8⁺ CTLs has emerged as a crucial and effective, effector mechanism against intracellular pathogens (3). For a peptide to be immunogenic, it must be efficiently processed and presented in association with MHC molecules to CTLs with a complementary T cell receptor. Remarkably, confrontation with complex pathogens usually results in the generation of cytotoxic activity focused on a single, or at most a few, epitopes (4-6). *A priori*, such limited diversity of CTL response repertoire appears hazardous for the host. Viruses, such as human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, influenza A virus and lymphocytic choriomeningitis virus may be initially controlled by CTLs but subsequently escape through mutation of the relevant epitope (7-11). Constraints related to antigen processing and to the availability of complementary TCRs are not sufficient to explain why, during the course of an immune response, the number of epitopes recognized by cytotoxic CD8⁺ cells is so drastically restricted. Indeed, studies of CTL responses to viruses, tumor antigens, and minor histocompatibility antigens (MiHAs) have shown that the diversity of CTL response is further limited by immunodomination: the presence of some dominant epitopes suppresses generation of CTLs specific for other immunogenic non-dominant epitopes (12-16). Non-dominant epitopes elicit CTL responses when they are presented alone but they are neglected when presented with dominant epitopes.

Suppression of CTL cytotoxic response toward immunodominated epitopes is not due to competition for binding to MHC class I molecules. In fact, immunodomination is frequently observed between peptides that are presented by different class I allomorphs such as K^b and D^b on APCs (5). Moreover, immunodomination is not associated with decreased expression of non-dominant peptides at the cell surface in the presence of dominant peptides (12, 17). Implicit in the definition of immunodomination is the notion that whether or not an epitope will elicit a response depends on its own characteristics as well as on those of co-presented epitopes. Therefore, since epitope A may dominate B but be dominated by C, its designation as dominant or not is relative and potentially

ambiguous. Comparison of B6^{dom1} and HY MiHAs has therefore been an instructive paradigm to study immunodomination (12, 14, 15, 18, 19). Indeed, these two epitopes lie at opposite ends on the dominance scale in H2^b mice. HY elicits CD8 cytotoxic response when presented alone but not when presented with one or numerous autosomal MiHAs (12, 20). On the contrary, that B6^{dom1} is always dominant means that it induces CD8 cytotoxic effectors when presented with hundreds of MiHAs (12, 15). Both B6^{dom1} and HY are H2D^b-associated nonapeptides. HY is encoded by the *Uty* gene whereas B6^{dom1} is encoded by the *H7* locus at the telomeric end of chromosome 9 (15, 19, 21-23). Studies of CTL responses to B6^{dom1} and HY showed that immunodomination is found only when both dominant (B6^{dom1}) and non-dominant (HY) epitopes are presented on the same APC, and does not occur when they are presented concomitantly on separate APCs (12). This observation has been confirmed with other antigen combinations (17, 24) and it indicates that immunodomination results from competition between responding CTL populations that recognize epitopes on the same APC (14).

This work aims to decipher the mechanism of immunodomination: how the presence of a dominant epitope (B6^{dom1}) prevents generation of a cytotoxic response to a non-dominant determinant (HY) presented on the same APC.

METHODS

Mice. The following strains of mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and bred at the Guy-Bernier Research Center: C3H.SW, C57BL/6J (B6), C57BL/6-*Pfp*^{tm1 Arp} (B6.PKO), and C57BL/10J (B10). B10.C-*H7*^b(47N)/Sn (B10.H7^b) breeder mice were a kind gift of Dr. D. C. Roopenian (The Jackson Laboratory). Mice used between 6 and 16 weeks of age were maintained in specific pathogen-free conditions according to the standards of the Canadian Council on Animal Care.

Immunization and adoptive transfer. Mice were primed by i. p. injection of 2×10^7 spleen cells. In adoptive transfer experiments, spleen cell suspensions containing 5×10^6 CD8⁺ T cells were injected via the tail vein in irradiated (10 Gy) recipients.

Peptides. B6^{dom1} (AAPDNRETF) and HY (WMHHNMDLI) peptides were synthesized by the Sheldon Biotechnology Centre (Montreal, Canada). Purity, as determined by reversed phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis, was above 97%.

MHC class I/peptide tetramers. MHC class I (H2D^b)/peptide (B6^{dom1} or HY) tetramers were produced as previously described (25, 26). Recombinant β_2 -microglobulin and the extracellular domain of the MHC class I heavy chain containing the BirA recognition sequence in-frame at its C terminus were overexpressed in *Escherichia coli* as insoluble aggregates that formed inclusion bodies. Purified inclusion bodies were solubilized in urea, and monomeric H2D^b complexes were refolded around peptide by dilution of denaturing buffer. Monomeric complexes were recovered by anion exchange chromatography over a Mono Q HR column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). H2D^b/peptide complexes were biotinylated using BirA enzyme (Avidity, Denver, CO) as described (27). Tetramers were generated by mixing the biotinylated monomeric complexes with NeutrAvidin-PE (Molecular Probes, Eugene, OR) at a 6:1 molar ratio. Then, biotinylated tetramers were purified by gel filtration over a Superdex 200 HR column (Pharmacia). Purified tetramers were stored at 1 mg/ml at 4°C and were

frequently tested on B6^{dom1}- and HY-specific T cell lines to document maintenance of staining capacity and signal intensity. B6^{dom1}- and HY-specific CD8⁺ T cell lines have been previously described (22, 23).

Cell staining and flow cytometry. Cell suspensions were stained with allophycocyanin-conjugated anti-CD8 antibody (Pharmingen, Mississauga, Canada), sometimes with 1B11 antibody (Pharmingen), in PBS/BSA 0.1% for 25 min at 4°C, washed, and then incubated with 1 µg PE-labeled tetramers at 37°C for 40 min. TCR expression was monitored for antigen specific T cell lines with FITC-conjugated anti-TCRαβ antibody (Pharmingen). Cells were analyzed on a FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA) using CELLQuest™ software. Intracellular perforin labeling was performed as previously described (28). Briefly, splenocytes from mice primed *in vivo* against either B6^{dom1} or HY were incubated for 5 h with irradiated B10 male spleen cells in culture medium supplemented with 2 µg ml⁻¹ brefeldin A (Sigma, Oakville, Canada), washed and permeabilized with 0.1% saponin (Sigma), and stained with anti-perforin antibody (clone KM585; Kamiya Biomedical, Seattle, WA) (29). Results for group means were compared using Student's *t* test.

RESULTS

Recognition of B6^{dom1} prevents expansion of HY-specific CD8⁺ T cells. *In vitro* studies have shown that T cell activation can elicit a diverse array of effector activities and that there is a hierarchy of thresholds to activate T cells for different functions (30, 31). In the case of naïve CTLs, induction of perforin-dependent cytotoxicity is the most stringently controlled function and is elicited only by strong agonists that induce optimal TCR signals. Thus, antigen presentation can result in expansion of CD8⁺ T cells that display no effector function or that produce cytokines such as IL-2 and IFN γ but are not cytotoxic (16, 29, 30, 32, 33). In previous studies of CTL immunodomination, the influence of dominant epitopes on response to non-dominant epitopes has been assessed essentially using cytotoxicity assays. Such estimations of cytotoxic activity allow no inference to be drawn as to whether immunodomination prevents expansion of CTLs specific for non-dominant antigens or whether it simply precludes development of cytotoxic activity by these CTLs. To address this fundamental issue, we used tetramer labeling to estimate expansion of B6^{dom1}- (dominant) and HY- (non-dominant) specific T cells 5 to 30 days after priming with 20 x 10⁶ spleen cells. Staining of B10 splenocytes as well as B6^{dom1}- and HY-specific cell lines showed that B6^{dom1}/D^b and HY/D^b tetramers were highly specific and sensitive reagents (Fig. 1).

Expansion of B6^{dom1}- and HY-tetramer⁺ cells was assessed in three combinations of priming cells/recipient mice which differed in i) HY, ii) HY and B6^{dom1}, or iii) HY + B6^{dom1} + numerous (more than 40) other MiHAs (Fig. 2). In mice primed solely against HY, we detected expansion of antigen-reactive CD8⁺ T cells that peaked at about day 15 (Fig. 2). This indicated that there are no inherent constraints to the expansion of CD8⁺ T cells specific for this non-dominant MHC class I-associated epitope. Results were strikingly different after priming with APCs expressing both HY and B6^{dom1}. In that case, expansion of HY-specific CD8⁺ T cells was almost totally abrogated ($p = 0.03$, HY alone versus HY with B6^{dom1}). Expansion of B6^{dom1}-specific T cells was unaffected when numerous other MiHAs were present on the priming APCs, whereas in the latter case no expansion of HY-specific T cells was detected. Together, these data show that

immunodomination prevents expansion of CTLs that recognize the non-dominant epitope HY. This finding excludes the alternative hypothesis that immunodomination might result in a quantitatively normal expansion of functionally defective HY-specific CTLs. Furthermore, our data show that the presence of a single dominant epitope is sufficient to inhibit expansion of HY-specific CTLs, whereas the presence of more than 40 other epitopes does not affect expansion of B6^{dom1}-specific CTLs.

Immunodomination is regulated by the T cell/APC ratio. Compelling evidence indicates that immunodomination results from competition between responding CTL populations that recognize dominant versus non-dominant epitopes. The essence of this competition however remains elusive. Recent studies using hematopoietic chimeras with variable frequency of antigen-specific T cells (TCR transgenic CD4 T cells specific for an I-E^k-restricted pigeon cytochrome peptide) have demonstrated an inverse relationship between the abundance of antigen-specific T cells and their level of expansion after antigen priming (34). At low frequency almost all T cells proliferated but at higher frequency of antigen-specific T cells, the proportion of cycling cells decreased irrespective of the number of antigen-bearing APCs. This suggests that there may be homeostatic regulation or some limitation of the total number of effector T cells generated during the course of immune response. Accordingly, expansion of antigen-responsive T cells would cease when the number of effector T cells reaches a given threshold. This could theoretically restrict the diversity of the repertoire of CTL responses and be instrumental in immunodomination when several epitopes are presented simultaneously. Alternatively, the fact that immunodomination takes place only when the dominant and the non-dominant epitopes are present on the same APC suggests that the crux of immunodomination is competition for APC resources (12, 15, 24). To address this, we estimated expansion of antigen-specific T cells in a model where the number of APCs expressing HY and/or B6^{dom1} was increased by several orders of magnitude. Splenocyte suspensions containing 5×10^6 CD8⁺ T cells were injected into irradiated recipients presenting selected MiHA differences, and the number of tetramer⁺ cells was assessed on days 9 and 15 (Fig. 3). HY and B6^{dom1} share the same tissue distribution profile. Both antigens are ubiquitous and well expressed on

hematopoietic APCs which have an essential role in priming of naïve CTLs (23, 35-37). Thus, in this model injected T cells were confronted with large quantities of antigen-positive APCs. Under these conditions, we found that the numbers of HY- and B6^{dom1}-specific CD8⁺ T cells were similar, regardless of whether their cognate antigens were presented alone, together, or with multiple MiHAs. Thus, when T cells encountered large numbers of APCs co-expressing HY and B6^{dom1} no immunodomination was found. We conclude that immunodomination results from competition for APC resources.

Effector function of CTLs specific for B6^{dom1} and HY epitopes. Why do T cells specific for B6^{dom1} compete successfully for APCs when presented with epitopes such as HY? One possibility is that because they have high precursor frequency or because they proliferate rapidly, B6^{dom1}-specific T cells simply outnumber HY-specific T cells at the APC surface. Results depicted in Fig. 2 and 3 argue against this. Indeed, when immunodomination was precluded because HY was presented alone or because high numbers of antigen-bearing APCs were present, the numbers of HY-specific T cells detected after antigen priming were similar to those of B6^{dom1}-specific T cells. Hence, if the difference between CD8⁺ T cells recognizing B6^{dom1} and HY is not quantitative, it is qualitative. Therefore, to determine whether B6^{dom1}-specific T cells displayed superior effector function, we assessed expression of O-glycans recognized by the 1B11 antibody on tetramer⁺ T cells 15 days after priming against either HY or B6^{dom1}. 1B11 monoclonal antibody is specific for epitopes on CD43 and CD45RB glycoproteins expressed on effector CD8⁺ T cells (38, 39). Expression of cell surface O-glycan epitopes is specifically upregulated on effector, as opposed to naïve and memory CTLs (40). Strikingly, when labeled with 1B11 antibody, the proportion of positive cells and the mean fluorescence intensity were ~ 77%/168 U for B6^{dom1}-specific T cells, but only ~ 29%/74 U for HY-specific T cells. Furthermore, B6^{dom1}-specific T cells had a much higher intracellular perforin content than HY-specific T cells (Fig. 4). These data support the idea that the critical issue involved in immunodomination is a question of CTL function rather than CTL numbers. CTLs that compete successfully for APC resources display superior effector function as evidenced by 1B11 labeling and perforin content.

Immunodomination prevails in the absence of perforin-mediated killing. Given the evidence that perforin-mediated killing is the main though not the sole mechanism responsible for elimination of APCs *in vivo* (19), and that CTLs responsible for immunodomination show greater intracellular perforin content (Fig. 4), we evaluated whether immunodomination would disappear in the absence of perforin. Here, the underlying assumption is that by killing APCs, CTLs specific for immunodominant determinants might reduce the duration of antigen presentation below a critical threshold and consequently impede the generation of CTL responses toward non-dominant antigens. This would be consistent with reports showing that the duration and/or the level of proliferation of antigen-reactive CTLs is increased in perforin-deficient mice (41, 42). To test our prediction we assessed expansion of HY-tetramer⁺ CD8⁺ T cells under two conditions: when HY was presented alone to wild-type mice (B6 male cells into female B6 mice), and when HY was presented with numerous other MiHAs to either perforin-deficient (C3H.SW cells into B6.PKO) or wild-type mice (C3H.SW cells into B6 female mice). As expected, in wild-type mice, expansion of HY-specific T cells was observed only when HY was presented alone (Fig. 5). The key finding was that immunodomination was not abrogated in perforin-deficient animals. Thus, immunodomination cannot be accounted for solely on the basis of perforin-mediated killing of APCs.

DISCUSSION

Our model has two noteworthy features. CD8⁺ T cell responses were studied in naive mice with a normal T cell repertoire: they were not transgenic, and their T cell repertoire was not modified by passively transferred T cells. Besides, antigens used for priming were normal endogenous epitopes expressed at physiological levels: APCs were not transgenic, transfected, or peptide-coated. Our relatively uncontrived model suggests several points. When two or more MHC class I-associated epitopes are found on the same APCs, the presence of a single dominant antigen, B6^{dom1}, is sufficient to cause immunodomination. Yet B6^{dom1} itself is resistant to immunodomination when co-presented with more than 40 other epitopes. Immunodomination prevents expansion rather than differentiation of CD8⁺ T cells that recognize a non-dominant epitope, HY, and is regulated by the CTL/APC ratio. Of special interest, the key difference between T cells that recognize B6^{dom1} and those recognizing HY is qualitative or functional rather than quantitative. The notable feature of T cells specific for B6^{dom1} is that they show striking upregulation of molecules involved in CTL effector activity and not that they accumulate to particularly high levels (as assessed by tetramer staining).

One surprising finding was that, when immunodomination was precluded (Fig. 2 and 3), the rate of accumulation of HY-tetramer⁺ T cells was similar to that of B6^{dom1}-tetramer⁺ T cells. Thus, the dominant status of B6^{dom1} does not depend on an intrinsically higher proliferative activity of cognate CD8⁺ T cells. The crucial difference between HY- and B6^{dom1}-specific T cells relates to their CTL effector activity estimated on the basis of two parameters: the expression of O-glycans recognized by 1B11 antibody and the intracellular perforin content. Compared with B6^{dom1}-tetramer⁺ T cells, HY-tetramer⁺ T cells can proliferate as vigorously, yet are defective in acquiring effector function. This observation is consistent with recent evidence that, although T cell proliferation and acquisition of effector function are often correlated, they are not mechanistically linked (34). Supporting this idea, activated CD8⁺ T cells have been shown to vary in their lytic potential, a discrepancy determined by the nature of the epitope which they recognize (16, 33). Thus, even though HIV-specific CD8⁺ T cells

can be present at very high frequencies in HIV infected subjects, these CTLs remain crippled in terms of cytotoxic activity relative to CMV-specific CTLs (29, 43). Our study suggests that, aside from its impact on eradication of intracellular pathogens, development of effector function by CTLs is responsible for immunodomination, and is thereby instrumental in shaping the repertoire of CTL responses. How does the nature of a given epitope regulate the development of effector function in cognate CTLs? Previous studies with B6^{dom1} provide evidence that epitope density may be a key determinant because of its influence on the efficiency of TCR triggering (15). This contention is supported by the fact that while B6^{dom1}/D^b complexes do not interact with their respective TCR with higher affinity than HY/D^b complexes, the former epitopes are much more abundant at the surface of APCs: 1000 versus 10 copies per cell for B6^{dom1} and HY, respectively (15)

The fact that immunodomination is regulated by the CTL/APC ratio suggests that its essence is competition for APC resources (Fig. 3). This is consistent with studies of Kedl et al. (24) in a model based on immunization of mice with peptide-coated dendritic cells and adoptive transfer of TCR transgenic OT1 T cells specific for the dominant K^b-associated ovalbumin peptide. These authors showed that injection of OT1 CD8⁺ T cells inhibited the response of host antigen-specific T cells to two ovalbumin-derived peptides, and that this inhibition could be overcome by the injection of large numbers of antigen-pulsed dendritic cells. Our work extends these results in a non-transgenic model in which mice with a normal T cell repertoire were confronted with endogenous epitopes expressed at physiological levels.

How does competition for APC resources lead to the selective expansion of CTL specific for dominant epitopes and to the neglect of non-dominant epitopes? We consider the following three observations. When immunodomination occurred, expansion of CTLs that recognize HY was aborted and not merely delayed (Fig. 2). Immunodomination was prevented when APCs were present in very high numbers (Fig. 3). CTLs specific for B6^{dom1} displayed superior effector function (Fig. 4) but not a higher intrinsic proliferative potential (Fig. 3). These data argue against two proposed

mechanisms for CTL competition which hinge on the assumption that CTLs specific for dominant epitopes might simply monopolize access to the APC surface without impairing APC number or function (15, 24). First, it has been conjectured that, because of more rapid or extensive expansion, CTLs specific for dominant epitopes might simply outnumber other CTLs at the APC surface (15, 18). Clearly, the rate of expansion of CTL populations in our experiments was not consistent with the prediction that B6^{dom1}-specific CTLs are endowed with a higher proliferative potential than their competitors. A second hypothesis was that by sticking to APCs, CTLs that recognize the dominant epitope could physically deny access by other CTLs to the APC surface or to APC molecules recruited at the site of the immunological synapse (24). However, it is hard to reconcile this premise with evidence that antigen-specific naïve T cells are rare, enter lymphoid organs asynchronously, and maintain vigorous migration upon cognate interactions with APCs (44). Since each T cell-APC encounter is short-lived, with a median duration between 6 to 12 min, it is difficult to imagine how CTLs specific for a given epitope could monopolize access to the surface of antigen-bearing APCs during a period of several days if the latter APCs remain functional.

We surmise that to abort the priming of competitor CTLs, B6^{dom1}-specific CTLs must rapidly curtail the number or the function of antigen-bearing APCs. In doing this, because of their superior effector activity, they reduce the time of interaction between competent APCs and CTLs below the duration threshold required to prime CTLs that recognize non-dominant epitopes. First, this could be achieved by killing antigen-bearing APCs. Supporting reports demonstrate that some (19, 45), but not all (24), CD4⁺ and CD8⁺ T cells rapidly eliminate antigen-bearing APCs *in vivo*. One report (24) made use of exogenous peptide-coated APCs where interactions with CTLs apparently had no influence on the fate of APCs. This approach may lead to an overestimation of APC survival since the half-life of peptide-MHC class I complexes at 37°C is usually a matter of a few hours (12, 15). Notably, we showed that CTLs specific for B6^{dom1} rapidly eliminate APCs *in vivo* whereas CTLs specific for HY do not (19). Our demonstration that B6^{dom1}-specific CTLs are endowed with superior effector activity (Fig. 4) provides a cogent explanation for this discrepancy. Nevertheless, here we furnish conclusive

evidence that perforin-mediated killing by itself is not required to cause immunodomination (Fig. 5). However, this observation should not be construed as a demonstration that immunodomination does not involve APC killing because other effector pathways such as involving ligands of the TNF family, might contribute to the rapid demise of antigen-bearing APCs *in vivo* (19). Second, CTLs specific for a dominant epitope could, because of their high effector activity, rapidly lead to exhaustion of APCs. This assumption is consistent with evidence that within 24 h after antigen presentation, naïve CD8⁺ T cells are able to trigger dendritic cell maturation (46), a process that can rapidly lead to dendritic cell exhaustion within a few hours (47). The paradigm that immunodomination bears on the rapid physical or functional demise of antigen-bearing APCs leads to testable predictions that we are currently addressing.

Regardless of whether it is caused by APC killing or APC exhaustion, the main consequence of immunodomination is to restrict the diversity of the repertoire of CTL responses. Deng *et al.* raised the interesting possibility that the *raison d'être* of this limitation may be to lessen the risk of collateral autoimmune damage by crossreactive CTLs (13). Collectively, our data suggest that immunodomination entails selective expansion of CTLs with the best effector function, favoring quality over quantity, which is clearly wise strategy.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Staining of splenocytes and antigen-specific cell lines with B6^{dom1}/D^b and HY/D^b tetramers. Labeling with anti-CD8 antibody and tetramers was performed on B6^{dom1}- and HY-specific CD8⁺ cell lines. Splenocytes from B10 male mice, which express B6^{dom1} and HY MiHAs, served as additional negative controls..

Figure 2. Recognition of B6^{dom1} prevents expansion of HY-specific CD8⁺ T cells. Percentage of B6^{dom1}- and HY-tetramer⁺ cells were assessed in three combinations of priming cells/recipient mice (incompatible MiHAs): **i)** B10.H7^b male cells injected in B10.H7^b female mice (HY); **ii)** B10 male cells in B10.H7^b female mice (HY + B6^{dom1}); and **iii)** B10 male cells in C3H.SW female mice (HY + B6^{dom1} + numerous other MiHAs). The number of MiHA differences between C3H.SW and B10 mice is estimated to be over 40 (48, 49). Each dot represents one individual. Lines indicate the mean percentage of B6^{dom1}- and HY-tetramer⁺ cells at various times with 3 to 7 mice per group.

Figure 3. Expansion of B6^{dom1}- and HY-specific CD8⁺ T cells after adoptive transfer to irradiated recipients. Spleen cell suspensions containing 5×10^6 CD8⁺ T cells were injected via the tail vein in irradiated (10 Gy) recipients. Donors and recipients were either syngeneic or different for **i)** HY; **ii)** B6^{dom1}; **iii)** HY and B6^{dom1}; or **iv)** HY + B6^{dom1} + numerous other MiHAs. Absolute numbers of CD8⁺ tetramer⁺ cells were estimated on days 9 and 15 after transfer. Bars represent the mean values for two mice per time.

Figure 4. Expression of cell surface O-glycan epitopes and intracellular perforin content. **Panel A)** Staining with 1B11 antibody was assessed on spleen tetramer⁺ cells 15 days after priming against HY (B10 female mice injected with B10 male cells), or B6^{dom1} (B10.H7^b male mice injected with B10 male cells). **Panel B)** Intracellular perforin staining. Splenocytes from mice primed against HY or B6^{dom1} (as in panel A) were incubated for 5 h with irradiated B10 male spleen cells expressing HY and B6^{dom1}

antigens in culture medium supplemented with brefeldin A, then permeabilized with saponin, and stained with anti-perforin antibody. For both panels A and B, flow cytometry data from one representative experiment are shown and the mean results \pm SD of three experiments are presented. Splenocytes from unprimed mice served as negative controls.

Figure 5. Immunodomination prevails in perforin-deficient mice. Expansion of HY-tetramer⁺ CD8⁺ T cells when HY was **i)** presented alone to wild-type mice (B6 male cells into B6 female mice), or **ii)** presented with numerous other MiHAs to either perforin-deficient or wild-type female mice (C3H.SW male cells into B6.PKO or B6 female mice, respectively). Each dot represents one individual. Lines indicate the mean percentage of HY-tetramer⁺ cells at various times with 3 to 6 mice per group.

REFERENCES

1. Zinkernagel, R.M. 1996. Immunology taught by viruses. *Science* 271:173-178.
2. Brodsky, F.M., L.Lem, A.Solache, and E.M.Bennett. 1999. Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunol.Rev.* 168:199-215.
3. Harty, J.T., A.R.Tvinnereim, and D.W.White. 2000. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu.Rev.Immunol.* 18:275-308.
4. Weidt, G., O.Utermöhlen, J.Heukeshoven, F.Lehmann-Grube, and W.Deppert. 1998. Relationship among immunodominance of single CD8⁺ T cell epitopes, virus load, and kinetics of primary antiviral CTL response. *J.Immunol.* 160:2923-2931.
5. Yewdell, J.W. and J.R.Bennink. 1999. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu.Rev.Immunol.* 17:51-88.
6. Wallace, M.E., R.Keating, W.R.Heath, and F.R.Carbone. 1999. The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. *J.Virol.* 73:7619-7626.
7. Borrow, P., H.Lewicki, X.Wei, M.S.Horwitz, N.Peffer, H.Meyers, J.A.Nelson, J.E.Gairin, B.H.Hahn, M.B.Oldstone, and G.M.Shaw. 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat.Med.* 3:205-211.
8. Goulder, P.J., R.E.Phillips, R.A.Colbert, S.McAdam, G.Ogg, M.A.Nowak, P.Giangrande, G.Luzzi, B.Morgan, A.Edwards, A.J.McMichael, and S.Rowland-Jones. 1997. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat.Med.* 3:212-217.

9. Klenerman, P. and R.M.Zinkernagel. 1998. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature* 394:482-485.
10. Wang, H. and D.D.Eckels. 1999. Mutations in immunodominant T cell epitopes derived from the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus have the potential for generating escape variants that may have important consequences for T cell recognition. *J.Immunol.* 162:4177-4183.
11. Price, G.E., R.Ou, H.Jiang, L.Huang, and D.Moskophidis. 2000. Viral escape by selection of cytotoxic T cell resistant variants in influenza A virus pneumonia. *J.Exp.Med.* 191:1853-1867.
12. Pion, S., P.Fontaine, M.Desaulniers, J.Jutras, J.G.Filep, and C.Perreault. 1997. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur.J.Immunol.* 27:421-430.
13. Deng, Y., J.W.Yewdell, L.C.Eisenlohr, and J.R.Bennink. 1997. MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J.Immunol.* 158:1507-1515.
14. Perreault, C., D.C.Roy, and C.Fortin. 1998. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol.Today* 19:69-74.
15. Pion, S., G.J.Christianson, P.Fontaine, D.C.Roopenian, and C.Perreault. 1999. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 93:952-962.
16. Chen, W., L.C.Anton, J.R.Bennink, and J.W.Yewdell. 2000. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 12:83-93.

17. Wolpert, E.Z., P. Grufman, J.K. Sandberg, A. Tegnesjö, and K. Kärre. 1998. Immunodominance in the CTL response against minor histocompatibility antigens: interference between responding T cells, rather than with presentation of epitopes. *J. Immunol.* 161:4499-4505.
18. Perreault, C., S. Pion, and D.C. Roy. 2000. Mechanisms and implications of immunodominance. In *Minor Histocompatibility Antigens: From the Laboratory to the Clinic*. D. Roopenian and E. Simpson, editors. Landes Bioscience, Georgetown. 71-78.
19. Loyer, V., P. Fontaine, S. Pion, F. Héту, D.C. Roy, and C. Perreault. 1999. The *in vivo* fate of APCs displaying minor H antigens and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J. Immunol.* 163:6462-6467.
20. Wettstein, P.J. 1986. Immunodominance in the T cell response to multiple non-H-2 histocompatibility antigens. III. Single histocompatibility antigens dominate the male antigen. *J. Immunol.* 137:2073-2079.
21. Perreault, C., J. Jutras, D.C. Roy, J.G. Filep, and S. Brochu. 1996. Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 98:622-628.
22. Greenfield, A., D. Scott, D. Pennisi, I. Ehrmann, P. Ellis, L. Cooper, E. Simpson, and P. Koopman. 1996. An H-YD^b epitope is encoded by a novel mouse Y chromosome gene. *Nat. Genet.* 14:474-478.
23. Eden, P.A., G.J. Christianson, P. Fontaine, P.J. Wettstein, C. Perreault, and D.C. Roopenian. 1999. Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6^{dom1}) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J. Immunol.* 162:4502-4510.

24. Kedl,R.M., W.A.Rees, D.A.Hildeman, B.Schaefer, T.Mitchell, J.Kappler, and P.Marrack. 2000. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J.Exp.Med.* 192:1105-1114.
25. Altman,J.D., P.H.Moss, P.R.Goulder, D.H.Barouch, M.G.McHeyzer-Williams, J.I.Bell, A.J.McMichael, and M.M.Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96.
26. Gallimore,A., A.Glithero, A.Godkin, A.C.Tissot, Pl, T.Elliott, H.Hengartner, and R.Zinkernagel. 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J.Exp.Med.* 187:1383-1393.
27. Crawford,F., H.Kozono, J.White, P.Marrack, and J.Kappler. 1998. Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity* 8:675-682.
28. Slifka,M.K., F.Rodriguez, and J.L.Whitton. 1999. Rapid on/off cycling of cytokine production by virus-specific CD8⁺ T cells. *Nature* 401:76-79.
29. Appay,V., D.F.Nixon, S.M.Donahoe, G.M.Gillespie, T.Dong, A.King, G.S.Ogg, H.M.Spiegel, C.Conlon, C.A.Spina, D.V.Havlir, D.D.Richman, A.Waters, P.Easterbrook, A.J.McMichael, and S.L.Rowland-Jones. 2000. HIV-specific CD8⁺ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J.Exp.Med.* 192:63-76.
30. Bachmann,M.F., E.Sebzda, T.M.Kundig, A.Shahinian, D.E.Speiser, T.W.Mak, and P.S.Ohashi. 1996. T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. *Eur.J.Immunol.* 26:2017-2022.
31. Bachmann,M.F., A.Oxenius, D.E.Speiser, S.Mariathasan, H.Hengartner, R.M.Zinkernagel, and P.S.Ohashi. 1997. Peptide-induced T cell receptor down-regulation on naive T cells predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation. *Eur.J.Immunol.* 27:2195-2203.

32. Zajac, A.J., J.N. Blattman, K. Murali-Krishna, D.D. Sourdive, M. Suresh, J.D. Altman, and R. Ahmed. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 188:2205-2213.
33. Spencer, J.V. and T.J. Braciale. 2000. Incomplete CD8⁺ T lymphocyte differentiation as a mechanism for subdominant cytotoxic T lymphocyte responses to a viral antigen. *J. Exp. Med.* 191:1687-1698.
34. Laouar, Y. and I.N. Crispe. 2000. Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4⁺ T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity* 13:291-301.
35. Griem, P., H.J. Wallny, K. Falk, O. Rotzschke, B. Arnold, G. Schonrich, G. Hammerling, and H.G. Rammensee. 1991. Uneven tissue distribution of minor histocompatibility proteins versus peptides is caused by MHC expression. *Cell* 65:633-640.
36. Lenz, L.L., E.A. Butz, and M.J. Bevan. 2000. Requirements for bone marrow-derived antigen-presenting cells in priming cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* 192:1135-1142.
37. Sigal, L.J. and K.L. Rock. 2000. Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation. *J. Exp. Med.* 192:1143-1150.
38. Tomlinson Jones, A., B. Federspiel, L.G. Ellies, M.J. Williams, R. Burgener, V. Duronio, C.A. Smith, F. Takei, and H.J. Ziltener. 1994. Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. *J. Immunol.* 153:3426-3439.
39. Carlow, D.A., B. Ardman, and H.J. Ziltener. 1999. A novel CD8 T cell-restricted CD45RB epitope shared by CD43 is differentially affected by glycosylation. *J. Immunol.* 163:1441-1448.

40. Harrington, L.E., M.Galvan, L.G.Baum, J.D.Altman, and R.Ahmed. 2000. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J.Exp.Med.* 191:1241-1246.
41. Spaner, D., K.Raju, B.Rabinovich, and R.G.Miller. 1999. A role for perforin in activation-induced T cell death in vivo: increased expansion of allogeneic perforin-deficient T cells in SCID mice. *J.Immunol.* 162:1192-1199.
42. Badovinac, V.P., A.R.Tvinnereim, and J.T.Harty. 2000. Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon- γ . *Science* 290:1354-1357.
43. Gea-Banacloche, J.C., S.A.Migueles, L.Martino, W.L.Shupert, A.C.McNeil, M.S.Sabbaghian, L.Ehler, C.Prussin, R.Stevens, L.Lambert, J.Altman, C.W.Hallahan, J.C.L.B.de Quiros, and M.Connors. 2000. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8⁺ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J.Immunol.* 165:1082-1092.
44. Gunzer, M., A.Schäfer, S.Borgmann, S.Grabbe, K.S.Zänker, E.B.Bröcker, E.Kämpgen, and P.Friedl. 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 13:323-332.
45. Ingulli, E., A.Mondino, A.Khoruts, and M.K.Jenkins. 1997. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. *J.Exp.Med.* 185:2133-2141.
46. Ruedl, C., M.Kopf, and M.F.Bachmann. 1999. CD8⁺ T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo. *J.Exp.Med.* 189:1875-1884.
47. Langenkamp, A., M.Messi, A.Lanzavecchia, and F.Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of T_H1, T_H2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunol.* 1:311-316.
48. Bailey, D.W. 1970. Four approaches to estimating number of histocompatibility loci. *Transplant.Proc.* 2:32-38.

49. Loveland, B. and E. Simpson. 1986. The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor. *Immunol. Today* 7:223-229.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. R. P. Sékaly for the gift of plasmid clones, Dr. J. D. Altman for advice on the preparation of H2D^b-peptide tetramers, Drs. N. Labrecque and P. Santamaria for thoughtful review of the manuscript and Ms. J. Kashul for editorial assistance. Grant 011189 from the National Cancer Institute of Canada supported this work.

Figure 1

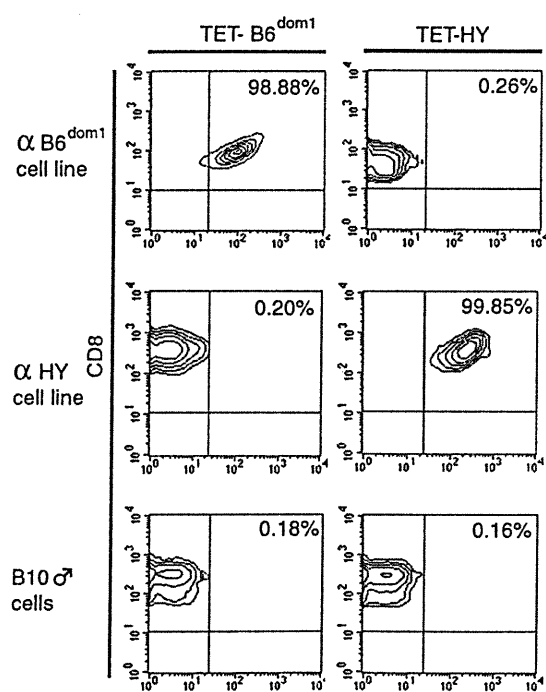


Figure 2

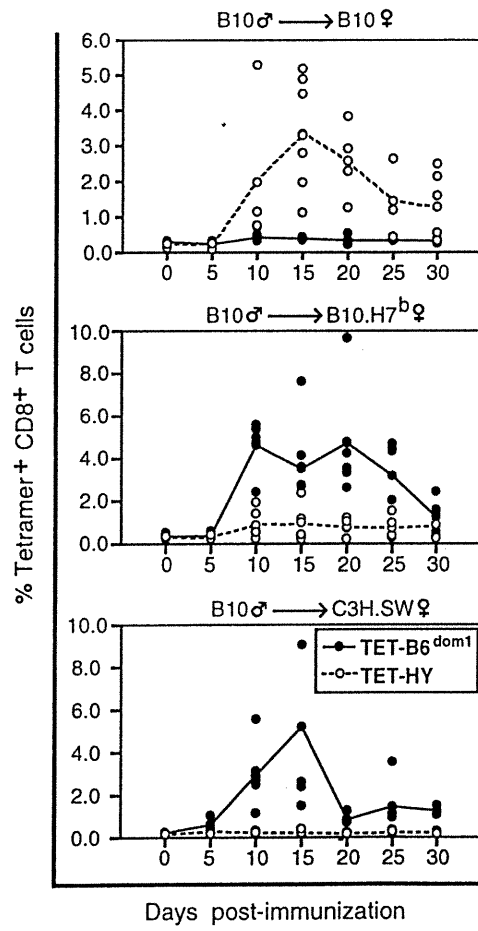


Figure 3

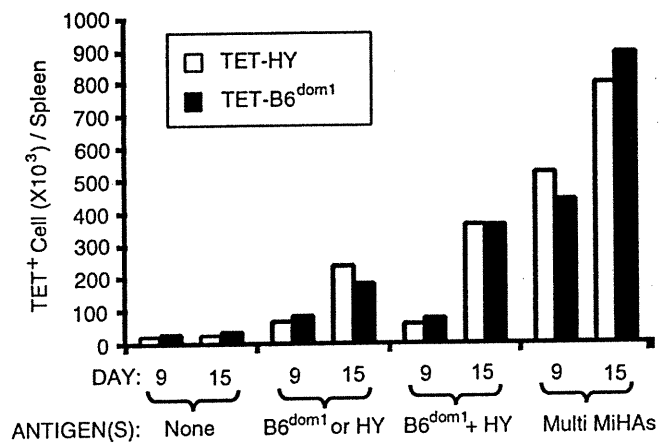


Figure 4

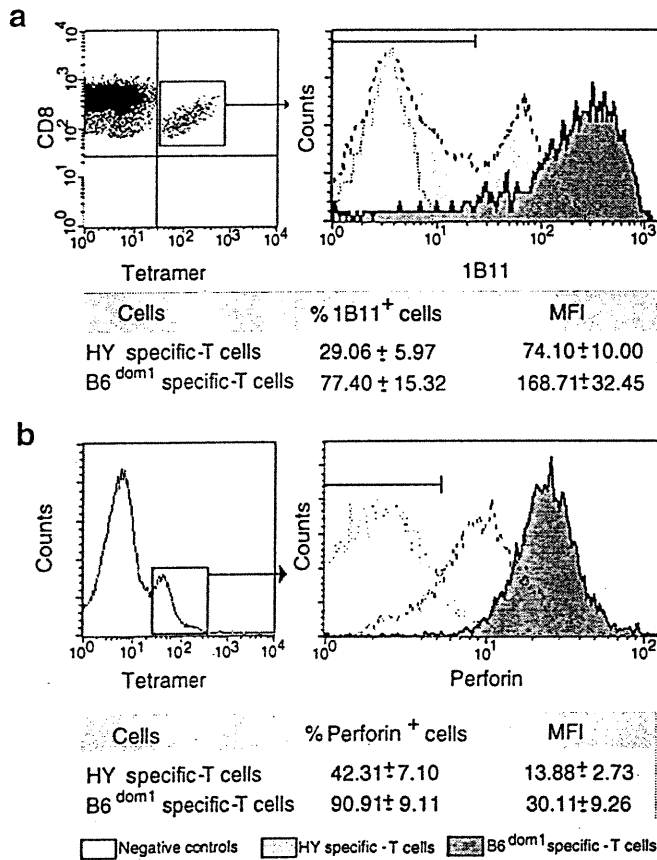
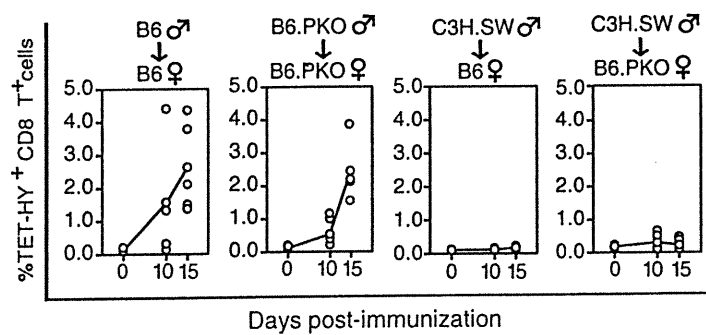


Figure 5



TROISIÈME PARTIE
DISCUSSION

Discussion

L'élément de base sur lequel repose toute la faisabilité des expérimentations de la présente étude est sans aucun doute l'efficacité des tétramères. Chaque étape de la synthèse des tétramères étant délicate, aucun test ne peut assurer, avant les contrôles finaux, leur efficacité fonctionnelle et leur qualité. Seul leur succès à identifier et quantifier correctement les cellules T CD8⁺ de lignées monospécifiques ainsi que leur haute sensibilité permet d'assurer la qualité des résultats obtenus aux cours des expérimentations.

C'est toutefois davantage par la spécificité des tétramères que cette étude a pu être réalisée dans un contexte physiologiquement normal. N'impliquant pas de souris transgéniques au niveau de leurs TCR ou de transferts spécifiques de cellules T, il fut possible d'étudier la réponse T CD8⁺ émergeant d'un répertoire naïf, normal et représentatif de la réalité physiologique. Les AgMiHs utilisés contribuent aussi à la qualité du modèle par leur mode de présentation antigénique, représentant des niveaux d'expression naturels. La solidité des résultats obtenus dans cette étude est ainsi attribuable non seulement à la représentativité des modèles choisis, mais aussi à la sensibilité et la spécificité des tétramères.

Essence des Résultats

Les tétramères démontrent bien d'abord que B6^{dom1} immunodamine HY, qu'il soit présenté seul ou avec une multitude d'autres mineurs. Ce résultat démontre bien l'impressionnante résistance de la dominance de B6^{dom1} parmi les AgMiHs. Il reste toutefois que le point dominant de cette première partie de l'étude est que l'immunodomination exercée par B6^{dom1} sur HY prévient l'expansion clonale de cellules T CD8⁺ spécifiques au non-dominant plutôt que de prévenir la différenciation des cellules vers des fonctions effectrices. La seconde partie de l'étude visant à observer l'impact du phénomène de compétition dans l'immunodominance, démontre que les processus menant à l'expansion préférentielle peuvent être modulés par le nombre des CPAs. La troisième partie de l'étude démontre bien que l'élément clé différenciant les

cellules reconnaissant le déterminant dominant B6^{dom1} et le non-dominant HY porte sur la fonction et non sur le nombre de cellules T antigène-spécifiques.

Prolifération vs Fonction

Techniquement, la cinétique d'expansion a apporté une réponse cruciale aux études précédentes en démontrant clairement que l'immunodomination était causée par l'absence d'expansion de T reconnaissant l'épitope non-dominant plutôt qu'une expansion de T non-fonctionnels, lorsque les épitopes sont présentés simultanément. Il est toutefois très surprenant d'observer dans la seconde partie de l'étude, que les taux d'expansion et niveaux d'accumulation sont similaires chez les cellules T reconnaissant B6^{dom1} ou HY. Ce résultat permet d'infirmer l'hypothèse selon laquelle une expansion plus rapide et plus importante des cellules reconnaissant l'antigène dominant, contribuerait au succès d'une compétition possible^{41,79}. Ainsi, nos résultats permettent d'affirmer que le statut dominant de B6^{dom1} ne dépend pas d'un potentiel prolifératif plus élevé.

L'étude des caractéristiques fonctionnelles des T spécifiques étant alors devenue la suite logique des études, les résultats obtenus démontrent que la différence cruciale entre les T spécifiques à B6^{dom1} ou HY est associée à leurs fonctions effectrices. En effet, des niveaux de production intracellulaire de perforine ainsi que des niveaux d'expression de O-glycan plus élevés chez les T spécifiques à B6^{dom1} que chez HY suggèrent fortement que malgré un potentiel prolifératif semblable, les T spécifiques à HY ont un potentiel effecteur plus faible. Différence probablement représentative d'un développement moindre des fonctions effectrices des T spécifiques au non-dominant.

Cette idée est d'ailleurs supportée par le fait que le développement de l'activité cytotoxique des T CD8⁺ est de plus en plus décrit comme un processus composé de plusieurs niveaux, dont celui de l'expansion clonale qui peut être dissocié du développement des fonctions effectrices⁸⁰. Cette différence est aussi supportée par le fait que selon l'épitope présenté, il est possible d'observer des variations au niveau de l'activité cytotoxique^{57,58,81,82}. Cette différence de cytotoxicité peut-être expliquée au niveau de l'activation moléculaire des cellules T. La densité de copies présentées d'un

épitope ainsi que l'interaction TCR-CMH/peptide détermine la force du signal TCR qui elle-même régule probablement le développement des fonctions effectrices^{22,41,79}.

Nos résultats suggèrent que l'acquisition différentielle des fonctions effectrices est la conséquence de l'immunodomination dans les réponses effectuées par les T CD8⁺.

Implication de la Compétition

L'immunodominance survenant uniquement lors de la présentation simultanée des épitopes sur la même CPA, ce paramètre de base implique la présence d'un certain processus de compétition. Un des principaux modèles proposés pour expliquer l'immunodomination suggère d'ailleurs que le surnombre d'une population aurait pour conséquence de contribuer au succès d'une compétition inter-population. Supportant cette idée, il fut observé que la pré-immunisation avec un épitope non-dominant peut parfois supprimer l'immunodominance lors d'une seconde immunisation, suggérant ainsi que la génération d'une grande quantité de T spécifiques pour l'épitope non-dominant leur permette de compétitionner plus efficacement²².

D'un autre point de vue, la nature même de toute compétition implique une certaine limitation des éléments convoités. Cette influence que l'aspect quantitatif des ressources pourrait avoir sur le destin de la réponse a mené la vision de l'étude de l'immunodominance à un autre niveau. Certains travaux ont bien démontré qu'une augmentation significative des ressources, telles des cellules dendritiques présentant un Ag donné permettaient de surmonter les phénomènes d'inhibitions de la réponse à un ou plusieurs autres Ags⁸³. L'immunodominance pourrait ainsi être modulée par la modification quantitative du facteur « ressources ».

Dans une de nos expériences, les cellules T anti-HY et anti-B6^{dom1} furent confrontées à des CPAs présentes en très grande quantité. Dans ce dernier cas, nos résultats démontrant la disparition de l'immunodomination de B6^{dom1} sur HY suggèrent que le phénomène de compétition pour les CPAs est un élément clé de l'immunodominance. Toutefois, comme les niveaux d'expansion spécifique sont similaires, il est impossible que le succès de cette compétition soit causé par un surnombre, réfutant ainsi le modèle précédemment proposé.

Il serait ainsi possible que dans un contexte de ressources limitées, le succès d'une compétition dépende non pas de la vitesse d'expansion, du niveau d'accumulation ou du potentiel prolifératif des différents T CD8⁺ spécifiques, mais plutôt d'une différence qualitative.

La Fonction Effectrice

Le succès qu'ont les cellules T spécifiques à B6^{dom1} à compétitionner contre les T spécifiques à HY et la différence au niveau de leur potentiel effecteur suggère fortement que ce dernier soit impliqué directement dans le succès de la compétition. En effet, il est possible que par leur fonction supérieure, les T spécifiques à B6^{dom1} éliminent les CPAs ou les rendent inaptes à activer correctement d'autres T CD8⁺ ^{84,85}, dans un laps de temps qui ne permet pas aux T spécifiques pour l'épitope non-dominant de s'activer efficacement (Figure 7). Supportant cette idée, de précédents travaux ont d'ailleurs démontré, *in vivo*, que les T cytotoxiques spécifiques à B6^{dom1} éliminaient plus rapidement les CPAs que les T spécifiques à HY³⁹.

L'investigation de la capacité de la perforine à moduler ainsi les mécanismes d'élimination des CPAs a mené, dans la dernière partie de l'étude, à étudier l'immunodomination chez des souris déficientes en perforine. Les résultats obtenus montrent que la perforine n'est pas essentielle pour que survienne l'immunodomination. Cependant, ceci n'implique pas que l'élimination des CPAs ne soit pas un facteur déterminant dans l'immunodomination. En effet, d'autres mécanismes effecteurs peuvent être impliqués dans l'élimination des CPAs.

Dans la plupart des circonstances, les cellules T cytotoxiques restreintes au CMH-I éliminent les cellules cibles via la perforine ^{86,87}. Toutefois, d'autres molécules comme les membres de la famille du TNF ou encore l'IFN- γ ont le potentiel de contribuer à cette élimination. Il est possible que les différents mécanismes redondants menant à l'élimination des CPAs contribuent ainsi à l'immunodomination.

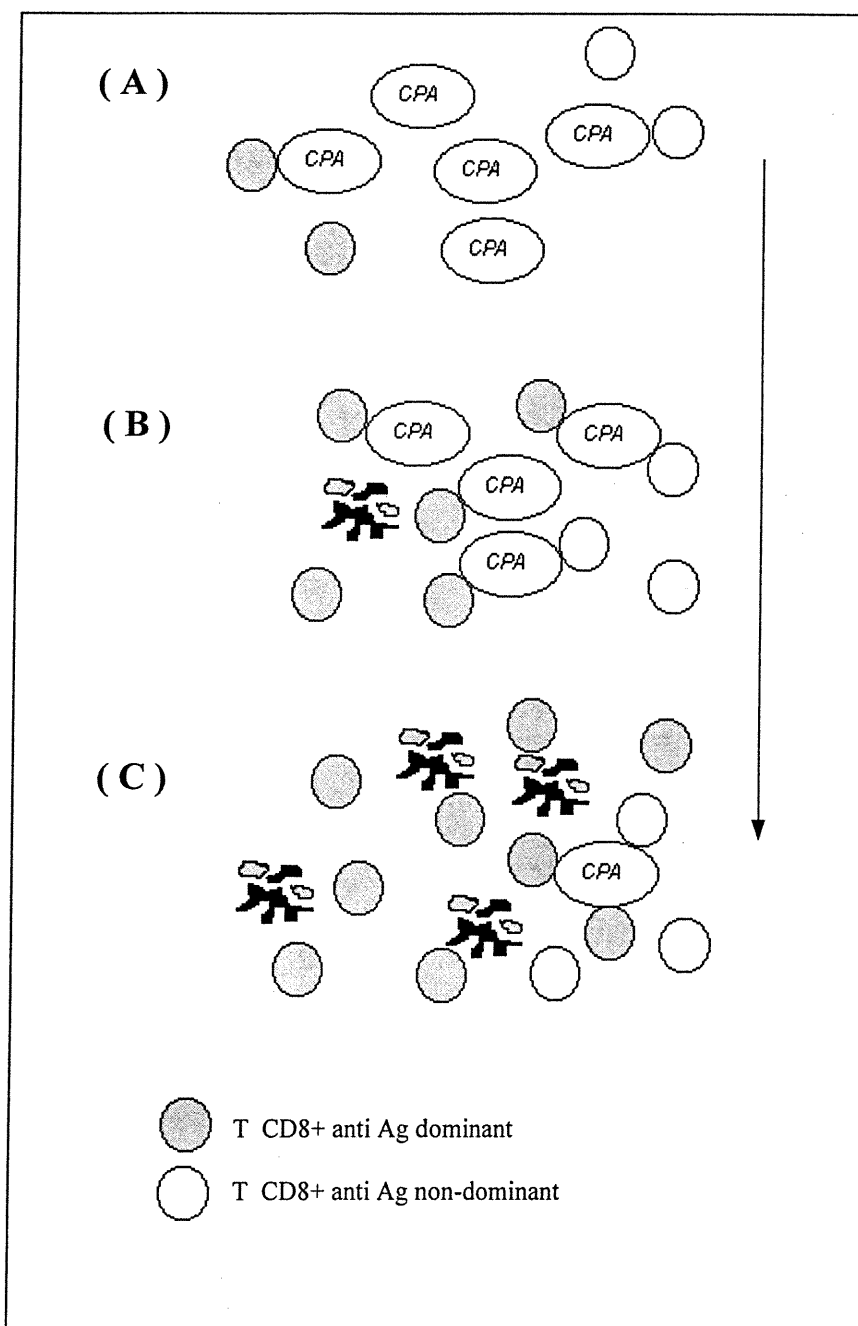


Figure 7 : *Résumé schématique du modèle d'immunodominance avec ressources limitées. Les lymphocytes T CD8⁺ rencontrent leurs cibles (A). L'activation plus rapide et plus efficace des T CD8⁺ anti dominant comparativement aux T CD8⁺ anti non-dominant, entraîne la destruction des CPAs par les T anti dominant (B). La pénurie de « ressources » causée par l'élimination massive des CPAs empêche le développement d'une réponse T anti non-dominant (C).*

Conclusion

L'ensemble des résultats émergeant de cette étude suggère que l'immunodomination est la conséquence d'une compétition pour les ressources que sont les CPAs et que le succès de cette compétition est associé à une différence fonctionnelle des compétiteurs.

Cette différence fonctionnelle étant vraisemblablement reliée à la nature même des Ags impliqués démontre bien que le système adaptatif favorise l'utilisation des meilleurs éléments possibles pour arriver à ses fins. En effet, comme le temps est une dimension importante suite à une infection quelconque et que le contrôle des pathogènes peut être une étape critique de la survie de l'hôte, il est primordial pour ce dernier de répondre le plus rapidement possible. L'utilisation des T CD8⁺ cytotoxiques les plus performants serait une excellente stratégie pour contribuer à réduire le temps de contrôle des pathogènes et à les éliminer plus efficacement. Toutefois, le fait de restreindre la « participation » des T spécifiques à la réponse adaptative vient à l'encontre de cette stratégie de défense rapide, intense et maximale.

À cet effet, la théorie développée par certains investigateurs⁸³ et qui semble être en concordance avec la nature même du système immunitaire qui est de protéger l'hôte, suggère que cette restriction de la réponse tire sa raison d'être dans l'un des rares côtés négatifs de la réponse immune. En effet, comme les TCRs sont des récepteurs dégénérés, il y a toujours possibilité que des cellules T répondant à un peptide d'origine pathogénique puissent réagir avec des peptides du soi par le phénomène de réactivité croisée. Un risque important et non-négligeable, pouvant mener au développement d'une réaction autoimmune. La restriction de la réponse par l'immunodomination pourrait ainsi faire partie du développement évolutif du système adaptatif, visant à contrer cet effet dérivé et dangereux de la réponse cytotoxique spécifique.

Les risques associés à l'évasion immune constituent toutefois la principale vulnérabilité entraînée par la restriction de la réponse. Des travaux ont néanmoins démontré que certaines réponses T cytotoxiques antivirales *in vivo* sont parfois beaucoup plus diversifiées que ce qu'il avait été hypothétiquement admis^{89,90,91}. Cependant, il est important de rappeler que l'immunodominance établit une hiérarchie

de réponses laissant parfois la place à d'autres réponses d'amplitude significative. Les variations observées entre individus relativement aux différences d'épitopes reconnus comme « dominant » soulèvent plusieurs points quant à la constance des principes d'immunodominance. Il reste toutefois que la variation inter-individuelle, les différences au niveau des haplotypes entre les individus ainsi que l'identification incomplète des épitopes reconnus, sont des paramètres non-négligeables qui restent à être investigués avant d'émettre certaines variances ou hypothèses quant aux principes de l'immunodominance.

Finalement, l'immunodominance contribuerait fondamentalement au développement d'une réponse adaptative d'efficacité maximale, avec le minimum de risques de dommage pour l'hôte, en favorisant la qualité de ses éléments effecteurs plutôt que leur quantité.

Perspectives Futures

Comme la perforine ne semble pas être impliquée dans les mécanismes d'éliminations des CPAs et que d'autres voies peuvent contribuer à cette élimination, il est normal que la suite première et logique de cette étude soit d'identifier ces mécanismes. L'utilisation de souris déficientes au niveau de certaines fonctions telles la famille du TNF ou l'IFN- γ , individuellement absents ou en combinaison, pourrait être un modèle intéressant, simple et efficace pour cette étude.

Quant aux niveaux de potentiel effecteur différents entre les T CD8⁺ spécifiques aux différents déterminants, l'étude de la force d'activation du signal 1 pourrait être une voie importante à investiguer, compte tenu de la relation possible entre la force d'activation et le niveau de cytotoxicité. L'étude moléculaire des mécanismes d'activation chez les cellules T CD8⁺ pourrait permettre d'établir un lien direct entre le niveau d'activation et le niveau des fonctions effectrices.

Toujours au niveau moléculaire, il serait aussi important d'analyser les différences d'affinité d'interactions TCR – CMH/peptide parmi les déterminants dominants et non-dominants. Pouvant être réalisée avec des tétramères de CMH-I, cette étude pourrait mener à une meilleure compréhension des mécanismes d'activation contribuant à la différence des potentiels effecteurs.

Plusieurs points restent à être investigués pour pouvoir comprendre la véritable place de l'immunodominance dans la réponse immune adaptative. La plupart des questions posées touchent d'ailleurs la nature fondamentale même de la biologie des cellules T. Cependant, même s'il semble rester encore beaucoup de chemin à parcourir, l'apparition de nouvelles technologies comme les tétramères de CMH ne peut que contribuer positivement à accélérer le rythme des découvertes et de la compréhension des mécanismes régulateurs de la réponse immune.

RÉFÉRENCES

1. Matsunaga T, Rahman A : What brought the adaptative immune systeme to vertebrates? The jaw hypothesis and seahorse. **Immunol. Review.** 166 : 177-186, 1998.
2. Anderson G, Hare KJ, Jenkinson EJ : Positive selection of thymocytes : The long and winding road. **Immunol. Today.** 20 : 463-468 , 1999.
3. Garcia CK : Molecular intercations between extracellular components of the T-cell receptor siganling complex. **Immunol. Rev.** 172 : 73-85, 1999.
4. Davis MM : Ligand recognition by a/b T-cell receptor. **Annu. Rev. Immunol.** 16 : 523-544, 1998.
5. Germain RN : MHC-dependant antigen processing and peptide presentation : providing ligands for T lymphocytes activation. **Cell.** 76 : 287-299, 1994.
6. Harty J, Tvinnereim AR, White DW : CD8+ T cell effector mecanisms in resistance to infection. **Annu. Rev. Immunol.** 18 : 275-308, 2000.
7. Busch DH, Pilip IM, Vijh S, Pamer EG : Coordonate regulation of complex T Cell population responding to bacterial infection. **Immunity.** 8 : 353-362, 1998.
8. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac A, Miller J Ahmed R : Counting antigen-specific CD8 T cells : a reevaluation of bystander activation during viral infection. **Immunity.** 8 : 177-187, 1998.
9. Shresta S, Pham CT, Thomas DA : How do Cytotoxic lymphocytes kill their targets?. **Curr. Opin. Immunol.** 10 : 581-587, 1998.

10. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russel JH, Ley TJ : Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic cells. **Cell.** 76 : 977-987, 1994.
11. Ebnet K, Haussmann M, Lehmann-Grube F, Mullbacher A, Kopf M : Granzyme A deficient-mice retain potent cell mediated cytotoxicity. **EMBO J.** 14 : 4230-4239. 1995.
12. Harty JT, Bevan MJ : Response of CD8 T cell to intracellular bacteria. **Curr. Opin. Immunol.** 11 :89-93, 1999.
13. Jones AT : Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. **J. Immunol.** 153 : 3426-3439, 1994.
14. Carlow DA, Ardman B, Ziltener HJ : A novel CD8 T cell-restricted CD45RB epitope shared by CD43 is differentially affected by glycosylation. **J. Immunol.** 163 : 1441-1448, 1999.
15. Harrington LE, Galvan M, Baum LG, Altman JD, Ahmed R : Differentiating between memory and effector CD8 T cell by altered expression of surface O-glycans. **J. Exp. Med.** 191 : 1241-1246, 2000.
16. Cresswell P, Bangia N, Dick T, Diedrich G : The nature of the peptide loading complex. **Immunol. Rev.** 172 : 21-28, 1999.
17. Solheim JC : Class-I MHC molecule : assembly and antigen presentation. **Immunol. Rev.** 172 : 11-19, 1999.
18. Yvonne Jone E, Tormo J, Reid SW, Stuart DI : Recognition surface of MHC class I. **Immunol. Rev.** 163 : 121-128, 1998.

19. Hughes EA, Hammond C, Cresswell P : Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated in the cytoplasm and degraded by the proteasome. **PNAS**. 94 : 1896-1901, 1997.
20. Weidt G, Utermöhlen O, Heukeshoven J, Lehmann-Grube F, Deppert W : Relationship among immunodominance of single CD8+ T cell epitopes, virus load, and kinetic of primary antiviral CTL response. **J. Immunol.** 160 : 2923-2931, 1998.
21. Wallace ME, Keating R, Heath WR, Carbone FR : The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. **J. Virol.** 73 : 7619-7626, 1999.
22. Yewdell JW, Benninck JR : Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocytes response. **Annu. Rev. Immunol.** 17 : 51-88, 1999.
23. Wettstein PJ : Immunodominance in the T cell response to multiple non-H2 histocompatibility antigens. II. Observation of a hierarchy among dominant antigens. **Immunogenetics.** 24 : 24-31, 1986.
24. Wettstein PJ, Bailey DW. Immunodominance in the immune response to « multiple » histocompatibility antigens. **Immunogenetics.** 16 : 47-58, 1982.
25. Tremblay N, Fontaine P, Perreault C : T-lymphocytes response to single and multiple minor histocompatibility antigens generate both self-major histocompatibility complex restricted and cross reactive T lymphocytes. **Transplantation.** 58 : 59-67, 1994.
26. Pion S, Fontaine P, Deslauniers M, Perreault C : On the mechanism of immunodominance in the cytotoxic T cell response to minor histocompatibility antigens. **Eur. J. Immunol.** 27 : 421-430, 1997.

27. Perreault C, Roy DC, Fortin C : Immunodominant minor histocompatibility antigens : the major ones. **Immunol. Today.** 19 : 69-74, 1998.
28. Zinkernagel RM, Althage A, Cooper S, Kreeb G, Klein PA, Sefton B, Flaherty L, Shreffler D, Klein J: Ir gene in H-2 regulate generation of antiviral cytotoxic T cell. Mapping to K or D and dominance of unresponsiveness. **J. Exp. Med.** 148 : 592-606, 1978.
29. Doherty PC, Biddison WE, Bennick JR, Knowles BB : Cytotoxic T cell response in mice infected with influenza and vaccinia viruses vary in magnitude with H-2 genotype. **J. Exp. Med.** 148 : 534-543, 1978.
30. Price G, Ou R, Jiang H, Huang L, Moskophidis D : Viral escape by selection of cytotoxic T cell resistant variants in influenza A virus pneumonia. **J. Exp. Med.** 191 : 1853-1867, 2000.
31. Klenerman P, Zinkernagel RM: Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocytes responses to viruses bearing variant epitopes. **Nature.** 394 : 482-485, 1998.
32. Wang H, Eckels DD : Mutations in immunodominant T cell epitope derived from the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus have the potential for generating escape variants that may have important consequence for T cell recognition. **J. Immunol.** 162 : 4177-4183, 1999.
33. Korngold, Sprent J : Lethal GVHD across minor histocompatibility barrier : Nature of the effector cell and role of H2 complex. **Immunol. Rev.** 71 : 5-29, 1983.
34. Loveland B, Simpson E : The non-MHC transplantation antigens : Neither weak nor minor. **Immunol. Today.** 7 : 223-229, 1986.

35. Perreault C, Décary F, Brochu S : Minor histocompatibility antigens. **Blood.** 76 :1269-1280, 1990.
36. Deng Y, Yewdell JW, Eisenlohr LC : MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance, all contribute to the paucity of MHC class-I restricted peptides recognized by antiviral CTL. **J. Immunol.** 158 : 1507-1515, 1998.
37. Sercarz EE, Lehmann PV, Ametani A : Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. **Annu. Rev. Immunol.** 11 : 729-766, 1993.
38. Pion S, Christianson GJ, Fontaine P, Roopenian DC, Perreault C : Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocytes response : explanation for the dominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. **Blood.** 93 :952-962, 1999.
39. Loyer V, Fontaine P, Pion S, Héту F, Roy DC, Perreault C : The in Vivo fate of Apcs displaying minor H Antigen and/or MHC difference is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-Associated epitopes. **J. Immunol.** 163 : 6462-6467, 1999.
40. Eden PA., Christianson GJ, Fontaine P, Wettstein PJ, Perreault C, Roopenian DC : Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B6^{dom1}) encoded by the classical *H7* minor histocompatibility locus. **J. Immunol.** 162 : 4502-4510, 1999.
41. Perreault C, Pion S, Roy DC : **Minor Histocompatibility Antigens : From the laboratory to the Clinic.** Roopenian D & Simpson E. Landes Biosciences. Georgetown. 71-78, 2000.

42. Perreault C, Jutras J, Roy DC, Filep JG, Brochu S : Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease. **J. Clin. Invest.** 98 : 622-628, 1996.
43. Greenfield A, Scott D, Pennisi D, Ehrmann I, Koopman P : An H-Ydb epitope is encoded by a novel Y chromosome gene. **Nature Genet.** 14 : 474-478, 1996.
44. Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Bluthmann H, von Boehmer H. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. **Nature.** 335 : 229-233, 1988.
45. Cole GA, Hogg TL, Coppola MA, Woodland DL : Efficient priming of CD8+ memory T cell specific for a subdominant epitope following Sendai virus infection. **J. Immunol.** 158 : 4301-4309, 1997.
46. Bousso P, Casrouge A, Altman JD, Haury M, Kanellopoulos J, Abastado JP, Kourilsky P. Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in the naive repertoires. **Immunity** : 9 : 169-178, 1998.
47. Niedermann G, Butz S, Ihlenfeldt HG, Grimm R, Lucchiari M, Eichmann K : Contribution of proteasome mediated proteolysis to the hierarchy of epitope presented by MHC class I molecule. **Immunity.** 2 : 289-299, 1995.
48. Fu TM, Mylin LM, Schell TD, Bacik I, Russ G, Yewdell JW, Bennick JR, Tevethia SS : An endoplasmic reticulum-targeting signal sequence enhance the immunogenicity of an immunorecessive simian virus 40 large T antigen cytotoxic T-lymphocytes epitope. **J. Virol.** 72 : 1469-1481, 1998.

49. Chen W, Khilko S, Fecondo J, Margulies DH, McCluskey J : Determinant selection of major histocompatibility complex class I-restricted antigenic peptides is explained by class I-peptide affinity and is strongly influenced by nondominant anchor residues. **J. Exp. Med.** 180 : 1471-1483, 1994.
50. Levitsky V, Zhang QJ, Leviskaya J, Masucci MG : The Life span of major histocompatibility complex-peptide influence the efficiency of presentation and immunogenicity of two class-I restricted T lymphocytes epitope in EBV nuclear antigen. **J. Exp. Med.** : 183 : 915-926, 1996.
51. Busch DH, Pamer EG. MHC class I/peptide stability : implication for immunodominance in vitro proliferation and diversity of responding CTL. **J. Immunol.** : 160 : 4441-4448, 1998.
52. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. **Nature** : 375 :148-151, 1995.
53. Valitutti S, Lanzavecchia A. Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition. **Immunol. Today**: 18 : 299-304, 1997.
54. Valitutti S, Muller S, Dessing M : Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. **J. Exp. Med.** : 183 : 1917-1921, 1996.
55. Bachmann MF, Oxenius A, Speiser DE, Mariathasan S, Hengartner H, Zinkernagel RM, Ohashi PS. Peptide-induced T cell receptor down-regulation on naive T cells predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation. **Eur. J. Immunol.** : 27 : 2195-2203, 1997

56. Bachmann MF, Sebзда E, Kundig TM, Shahinian A, Speiser DE, Mak TW, and P.S.Ohashi. T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. **Eur. J. Immunol.** : 26 : 2017-2022, 1996.
57. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DD, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. **J. Exp. Med.** : 188 : 2205-2213, 1998.
58. Spencer JV, Braciale TJ. Incomplete CD8⁺ T lymphocyte differentiation as mechanism for subdominant cytotoxic T lymphocyte response to viral antigen. **J. Exp. Med.** : 191 : 1687-1698, 2000.
59. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8⁺ T cells produce antiviral cytokine but are impaired in cytolytic function. **J. Exp. Med.** : 192 : 63-75, 2000.
60. McHeyzer-Williams MG, Nossal GJ, Lalor PA. Molecular characterization of single memory B cells. **Nature** : 350 : 502-505, 1991.
61. Carmichael A, Jin X, Sissons P, Borysiewicz L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. **J. Exp. Med.** : 177 : 249-256, 1993.
62. Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8⁺ memory T cells. **J. Exp. Med.** : 186 : 859-865, 1997.

63. Pape KA, Kearney ER, Khoruts A, Mondino A, Merica R, Chen ZM, Ingulli E, White J, Johnson JG, Jenkins MK. Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo. **Immunol. Rev.** : 156 : 67-78, 1997.
64. Teh HS, Kishi H, Scott B, Von Boehmer H. Deletion of autospecific T cells in T cell receptor (TCR) transgenic mice spares cells with normal TCR levels and low levels of CD8 molecules. **J. Exp. Med.** : 169 : 795-806, 1989.
65. McHeyzer-Williams MG, Davis MM. Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo. **Science** : 268 : 106-111, 1995.
66. Walker PR, Ohteki T, Lopez JA, MacDonald HR, Maryanski JL. Distinct phenotypes of antigen-selected CD8 T cells emerge at different stages of an in vivo immune response. **J. Immunol.** : 155 : 3443-3452, 1995.
67. Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. **PNAS** : 89 : 3429-3433, 1992.
68. Elliott TJ, Eisen HN. Cytotoxic T lymphocytes recognize a reconstituted class I histocompatibility antigen (HLA-A2) as an allogeneic target molecule. **PNAS** : 87 : 5213-5217, 1990.
69. Matsui K, Boniface JJ, Steffner P, Reay PA, Davis MM. Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. **PNAS** : 91 : 12862-12866, 1994.
70. Sykulev Y, Brunmark A, Jackson M, Cohen RJ, Peterson PA, Eisen HN. Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific T cell receptor and peptide-MHC complexes. **Immunity** : 1 : 15-22, 1994.

71. McHeyzer-Williams MG, Altman JD, Davis MM. Enumeration and characterization of memory cells in the TH compartment. **Immunol. Rev.** 150 : 5-21, 1996.
72. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. **Science** : 274 : 94-96, 1996.
73. McMichael AJ, O'Callaghan CA. A new look at T cells. **J. Exp. Med.** : 187 : 1367-1371, 1998.
74. Crawford F, Kozono H, White J, Marrack P, Kappler J. Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. **Immunity.** : 8 : 675-682, 1998.
75. Cameron TO, Cochran JR, Yassine-Diab B, Sekaly RP, Stern LJ. Cutting edge: detection of antigen-specific CD4+ T cells by HLA-DR1 oligomers is dependent on the T cell activation state. **J. Immunol.** : 166 : 741-745, 2001.
76. Romero P, Dunbar PR, Valmori D, Pittet M, Ogg GS, Rimoldi D, Chen JL, Lienard D, Cerottini JC, Cerundolo V. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. **J. Exp. Med.** : 188 : 1641-1650, 1998.
77. Dunbar PR, Ogg GS, Chen J, Rust N, van der Bruggen P, Cerundolo V. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. **Curr. Biol.** : 8 : 413-416, 1998.
78. Ogg GS, McMichael AJ. HLA-peptide tetrameric complexes. **Curr. Opin. Immunol.** : 10 : 393-396, 1998.

79. Whelan JA, Dunbar PR, Price DA, Purbhoo MA, Lechner F, Ogg GS, Griffiths G, Phillips RE, Cerundolo V, Sewell AK. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. **J. Immunol.** : 163 : 4342-4348, 1999.
80. Pion S, Christianson GJ, Fontaine P, Roopenian DC, Perreault C. Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. **Blood.** : 93 : 952-962, 1999.
81. Laouar Y, Crispe IN. Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4+ T cell proliferation and effector function in vivo. **Immunity.** : 13 : 291-301, 2000.
82. Chen W, Anton LC, Bennick JR, Yewdell JW. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell response to viruses. **Immunity** : 12 : 83-93, 2000.
83. Gea-Banacloche JC, Migueles SA, Martino L, Shupert WL, McNeil AC, Sabbaghian MS, Ehler L, Prussin C, Stevens R, Altman J, Hallahan CW, de Quiros JC, Connors M. Maintenance of large numbers of virus-specific CD8+ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. **J. Immunol.** : 165 : 1082-1092, 2000.
84. Kedl RM, Rees WA, Hildeman DA, Schaefer B, Mitchell T, Kappler J, Marrack P. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. **J. Exp. Med.** : 192 : 1105-1113, 2000.
85. Ruedl C, Kopf M, Bachmann MF. CD8(+) T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo. **J. Exp. Med.** : 189 : 1875-1884, 1999.

86. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nature Immunol.** : 1 : 311-316, 2000.
87. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. **Nature** : 369 : 31-37, 1994.
88. Bachmann MF, Ohteki T, Faienza KM, Zakarian A, Kagi D, Speiser DE, Ohashi PS. Altered peptide ligands trigger perforin- rather than Fas-dependent cell lysis. **J. Immunol.** : 159 : 4165-4170, 1997.
89. Betts MR, Casazza JP, Patterson BA, Waldrop S, Trigona W, Fu TM, Kern F, Picker LJ, Koup RA. Putative immunodominant human immunodeficiency virus-specific CD8(+) T-cell responses cannot be predicted by major histocompatibility complex class I haplotype. **J. Virol.** : 74 : 9144-9151, 2000.
90. Day CL, Shea AK, Altfeld MA, Olson DP, Buchbinder SP, Hecht FM, Rosenberg ES, Walker BD, Kalams SA. Relative dominance of epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons with shared HLA alleles. **J. Virol.** : 75 : 6279-6291. 2001.
91. Wong DK, Dudley DD, Dohrenwend PB, Lauer GM, Chung RT, Thomas DL, Walker BD. Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. **J. Virol.** : 75 : 1229-1235. 2001.
92. Simpson E, Scott D, Chandler P. The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. **Annu. Rev. Immunol.** : 15 : 39-61, 1997.

93. Fontaine P, Roy-Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. **Nat Med.** : 7 : 789-94, 2001.

ANNEXE

Immunodomination results from functional differences between competing CTL

Guillaume Roy-Proulx, Marie-Christine Meunier, Anne-Marie Lanteigne, Sylvie Brochu and Claude Perreault

Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Canada

The presence of dominant epitopes suppresses generation of CTL activity toward other non-dominant epitopes found on the same antigen-presenting cell (APC). This phenomenon, termed immunodomination, drastically restricts the diversity of the repertoire of CTL responses. Under various experimental conditions we assessed the *in vivo* expansion by tetramer staining and function by expression of O-glycans and intracellular perforin of CTL specific for a dominant (B6^{dom1}) and a non-dominant (HY) H2D^b-restricted epitope. Immunodomination abrogated expansion rather than differentiation of HY-specific CTL. When immunodomination was precluded because HY was presented alone or because high numbers of antigen-bearing APC were present, the numbers of HY-specific T cells detected after antigen priming were similar to those of B6^{dom1}-specific T cells. The main difference between T cells that recognized B6^{dom1} versus HY was functional rather than quantitative. The key feature of T cells specific for B6^{dom1} is that they show striking up-regulation of molecules involved in CTL effector activity rather than accumulating to particularly high levels, as assessed by tetramer staining. These results support the emerging concept that following antigen priming, CTL populations of similar size can display important differences in effector function, and suggest that these functional differences are instrumental in shaping the repertoire of CTL responses.

Received	15/2/01
Accepted	22/5/01

Key words: Cellular activation / Clonal expansion / CTL / Repertoire development / Vaccination

1 Introduction

The functioning of the adaptive immune system found in jawed vertebrates has been shaped by 450 million years of co-evolution with viruses and bacteria [1, 2]. Recognition of MHC class I/peptide complexes by CD8⁺ CTL has emerged as a crucial and effective, effector mechanism against intracellular pathogens [3]. For a peptide to be immunogenic, it must be efficiently processed and presented in association with MHC molecules to CTL with a complementary TCR. Remarkably, confrontation with complex pathogens usually results in the generation of cytotoxic activity focused on a single, or at most a few, epitopes [4–6]. *A priori*, such limited diversity of CTL response repertoire appears hazardous for the host. Viruses, such as human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, influenza A virus and lymphocytic choriomeningitis virus may be initially controlled by CTL but sub-

sequently escape through mutation of the relevant epitope [7–11]. Constraints related to antigen processing and to the availability of complementary TCR are not sufficient to explain why, during the course of an immune response, the number of epitopes recognized by cytotoxic CD8⁺ cells is so drastically restricted. Indeed, studies of CTL responses to viruses, tumor antigens, and minor histocompatibility antigens (MiHA) have shown that the diversity of CTL response is further limited by immunodomination: the presence of some dominant epitopes suppresses generation of CTL specific for other immunogenic non-dominant epitopes [12–16]. Non-dominant epitopes elicit CTL responses when they are presented alone but they are neglected when presented with dominant epitopes.

Suppression of CTL cytotoxic response toward immunodominated epitopes is not due to competition for binding to MHC class I molecules. In fact, immunodomination is frequently observed between peptides that are presented by different class I allomorphs such as K^b and D^b on APC [5]. Moreover, immunodomination is not associated with decreased expression of non-dominant peptides at the cell surface in the presence of dominant peptides [12, 17]. Implicit in the definition of immunodomi-

[1 21948]

Abbreviation: MiHA Minor histocompatibility antigen

tion is the notion that whether or not an epitope will elicit a response depends on its own characteristics as well as on those of co-presented epitopes. Therefore, since epitope A may dominate B but be dominated by C, its designation as dominant or not is relative and potentially ambiguous. Comparison of B6^{dom1} and HY MiHA has, therefore, been an instructive paradigm to study immunodomination [12, 14, 15, 18, 19]. Indeed, these two epitopes lie at opposite ends on the dominance scale in H2^b mice. HY elicits CD8 cytotoxic response when presented alone but not when presented with one or numerous autosomal MiHA [12, 20]. On the contrary, that B6^{dom1} is always dominant means that it induces CD8 cytotoxic effectors when presented with hundreds of MiHA [12, 15]. Both B6^{dom1} and HY are H2D^b-associated nonapeptides. HY is encoded by the *Uty* gene, whereas B6^{dom1} is encoded by the *H7* locus at the telomeric end of chromosome 9 [15, 19, 21–23]. Studies of CTL responses to B6^{dom1} and HY showed that immunodomination is found only when both dominant (B6^{dom1}) and non-dominant (HY) epitopes are presented on the same APC, and does not occur when they are presented concomitantly on separate APC [12]. This observation has been confirmed with other antigen combinations [17, 24] and it indicates that immunodomination results from competition between responding CTL populations that recognize epitopes on the same APC [14].

This work aimed at deciphering the mechanism of immunodomination: how the presence of a dominant epitope (B6^{dom1}) prevents generation of a cytotoxic response to a non-dominant determinant (HY) presented on the same APC.

2 Results

2.1 Recognition of B6^{dom1} prevents expansion of HY-specific CD8⁺ T cells

In vitro studies have shown that T cell activation can elicit a diverse array of effector activities and that there is a hierarchy of thresholds to activate T cells for different functions [25, 26]. In the case of naive CTL, induction of perforin-dependent cytotoxicity is the most stringently controlled function and is elicited only by strong agonists that induce optimal TCR signals. Thus, antigen presentation can result in expansion of CD8⁺ T cells that display no effector function or that produce cytokines such as IL-2 and IFN- γ but are not cytotoxic [16, 25, 27–29]. In previous studies of CTL immunodomination, the influence of dominant epitopes on response to non-dominant epitopes has been assessed essentially using cytotoxicity assays. Such estimations of cytotoxic activity allow no inference to be drawn as to whether immu-

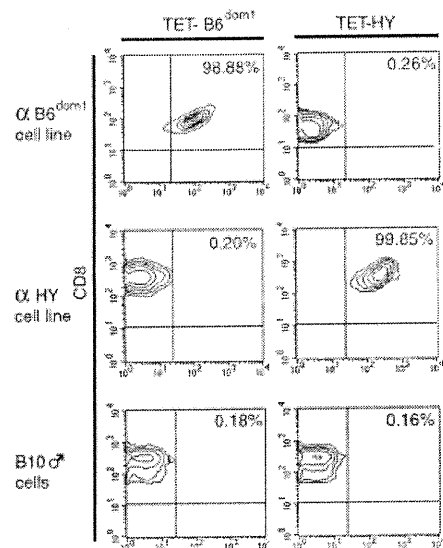


Fig. 1. Staining of splenocytes and antigen-specific cell lines with B6^{dom1}/D^b and HY/D^b tetramers. Labeling with anti-CD8 antibody and tetramers was performed on B6^{dom1}- and HY-specific CD8⁺ cell lines. Splenocytes from B10 male mice (gated on CD8⁺ cells), that express B6^{dom1} and HY MiHA, served as additional negative controls.

nodomination prevents expansion of CTL specific for non-dominant antigens or whether it simply precludes development of cytotoxic activity by these CTL. To address this fundamental issue, we used tetramer labeling to estimate expansion of B6^{dom1}- (dominant) and HY- (non-dominant) specific T cells 5–30 days after priming with 20 \times 10⁶ spleen cells. Staining of B10 splenocytes as well as B6^{dom1}- and HY-specific cell lines showed that B6^{dom1}/D^b and HY/D^b tetramers were highly specific and sensitive reagents (Fig. 1).

Expansion of B6^{dom1}- and HY-tetramer⁺ cells was assessed in three combinations of priming cells/recipient mice which differed in (i) HY, (ii) HY and B6^{dom1}, or (iii) HY + B6^{dom1} + numerous (more than 40) other MiHA (Fig. 2). In mice primed solely against HY, we detected expansion of antigen-reactive CD8⁺ T cells that peaked at about day 15 (Fig. 2). This indicated that there are no inherent constraints to the expansion of CD8⁺ T cells specific for this non-dominant MHC class I-associated epitope. Results were strikingly different after priming with APC expressing both HY and B6^{dom1}. In that case, expansion of HY-specific CD8⁺ T cells was almost totally abrogated ($p=0.03$, HY alone versus HY with B6^{dom1}). Expansion of B6^{dom1}-specific T cells was affected little, if at all, when numerous other MiHA were present on the priming APC, whereas in the latter case no expansion of HY-specific T cells was detected. Together, these data show that

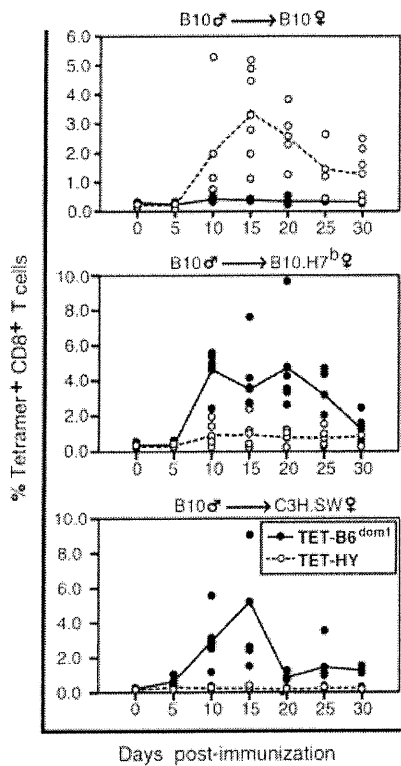


Fig. 2. Recognition of B6^{dom1} prevents expansion of HY-specific CD8⁺ T cells. Percentage of B6^{dom1}- and HY-tetramer⁺ cells were assessed in three combinations of priming cells/recipient mice (incompatible MiHA). Upper panel: B10 male cells injected in B10 female mice (HY); middle panel: B10 male cells in B10.H7^b female mice (HY + B6^{dom1}); and lower panel: B10 male cells in C3H.SW female mice (HY + B6^{dom1} + numerous other MiHA). The number of MiHA differences between C3H.SW and B10 mice is estimated to be over 40 [48, 49]. Each dot represents one individual. Lines indicate the mean percentage of B6^{dom1}- and HY-tetramer⁺ cells at various times with three to seven mice per group.

immunodomination prevents expansion of CTL that recognize the non-dominant epitope HY. This finding excludes the alternative hypothesis that immunodomination might result in a quantitatively normal expansion of functionally defective HY-specific CTL. Furthermore, our data show that the presence of a single dominant epitope is sufficient to inhibit expansion of HY-specific CTL, whereas the presence of more than 40 other epitopes does not significantly affect expansion of B6^{dom1}-specific CTL.

2.2 Immunodomination is regulated by the T cell/APC ratio

Compelling evidence indicates that immunodomination results from competition between responding CTL populations that recognize dominant versus non-dominant epitopes. The essence of this competition, however, remains elusive. Recent studies using hematopoietic chimeras with variable frequency of antigen-specific T cells (TCR transgenic CD4 T cells specific for an I-E^k-restricted pigeon cytochrome peptide) have demonstrated an inverse relationship between the abundance of antigen-specific T cells and their level of expansion after antigen priming [30]. At low frequency almost all T cells proliferated but at higher frequency of antigen-specific T cells, the proportion of cycling cells decreased irrespective of the number of antigen-bearing APC. This suggests that there may be homeostatic regulation or some limitation of the total number of effector T cells generated during the course of immune response. Accordingly, expansion of antigen-responsive T cells would cease when the number of effector T cells reaches a given threshold. This could theoretically restrict the diversity of the repertoire of CTL responses and be instrumental in immunodomination when several epitopes are presented simultaneously. Alternatively, the fact that immunodomination takes place only when the dominant and the non-dominant epitopes are present on the same APC suggests that the crux of immunodoma-

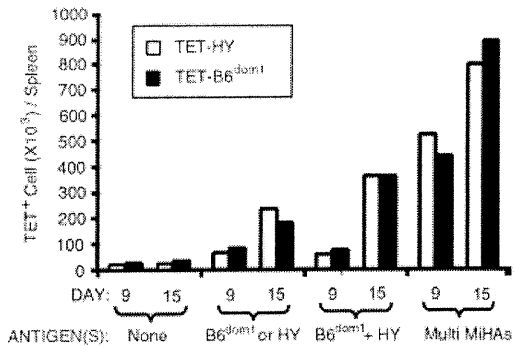


Fig. 3. Expansion of B6^{dom1}- and HY-specific CD8⁺ T cells after adoptive transfer to irradiated recipients. Spleen cell suspensions containing 5x10⁶ CD8⁺ T cells were injected via the tail vein in irradiated (10 Gy) recipients. Donors and recipients were either syngeneic (B10 male cells → B10 male hosts) or different for (i) HY (B10 female cells → B10 male hosts); (ii) B6^{dom1} (B10.H7^b male cells → B10 male hosts); (iii) HY and B6^{dom1} (B10 female cells → B10 male hosts); or (iv) HY + B6^{dom1} + numerous other MiHA (C3H.SW female cells → B10 hosts). Absolute numbers of CD8⁺ tetramer⁺ cells were estimated on days 9 and 15 after transfer. Bars represent the mean values for two mice per time.

tion is competition for APC resources [12, 15, 24]. To address this, we estimated expansion of antigen-specific T cells in a model where the number of APC expressing HY and/or B6^{dom1} was increased by several orders of magnitude. Splenocyte suspensions containing 5×10^6 CD8⁺ T cells were injected into irradiated recipients presenting selected MiHA differences, and the number of tetramer⁺ cells was assessed on days 9 and 15 (Fig. 3). HY and B6^{dom1} share the same tissue distribution profile. Both antigens are ubiquitous and well expressed on hematopoietic APC, which have an essential role in priming of naïve CTL [23, 31–33]. Thus, in this model injected T cells were confronted with large quantities of antigen-positive APC. Irradiated syngeneic recipients served as control to evaluate the homeostatic expansion of tetramer⁺ T cells in the absence of HY and B6^{dom1} antigens. Under these conditions, we found that the numbers of HY- and B6^{dom1}-specific CD8⁺ T cells were similar, regardless of whether their cognate antigens were presented alone, together, or with multiple MiHA. In fact, the greater the number of MiHA discrepancies between the host and injected T cells, the larger was the accumulation of HY- and B6^{dom1}-specific T cells. Thus, when T cells encountered large numbers of APC co-expressing HY and B6^{dom1} no immunodomination was found. This strongly supports the concept that immunodominance results from competition for APC resources.

2.3 Effector function of CTL specific for B6^{dom1} and HY epitopes

Why do T cells specific for B6^{dom1} compete successfully for APC when presented with epitopes such as HY? One possibility might be that B6^{dom1}-specific T cells simply outnumber HY-specific T cells at the APC surface. This could happen if B6^{dom1}-specific T cells had higher precursor frequency or proliferated more rapidly than HY-specific T cells. Results depicted in Fig. 2 and 3 argue against this. Indeed, when immunodomination was precluded because HY was presented alone or because high numbers of antigen-bearing APC were present, the numbers of HY-specific T cells detected after antigen priming were similar to those of B6^{dom1}-specific T cells. Hence, if the difference between CD8⁺ T cells recognizing B6^{dom1} and HY is not a question of numbers, it should be one of function. Therefore, to determine whether B6^{dom1}-specific T cells displayed superior effector function, we assessed expression of O-glycans recognized by the 1B11 antibody on tetramer⁺ T cells 15 days after priming against either HY or B6^{dom1}. 1B11 monoclonal antibody is specific for epitopes on CD43 and CD45RB glycoproteins expressed on effector CD8⁺ T cells [34, 35]. Expression of cell surface O-glycan epitopes is spe-

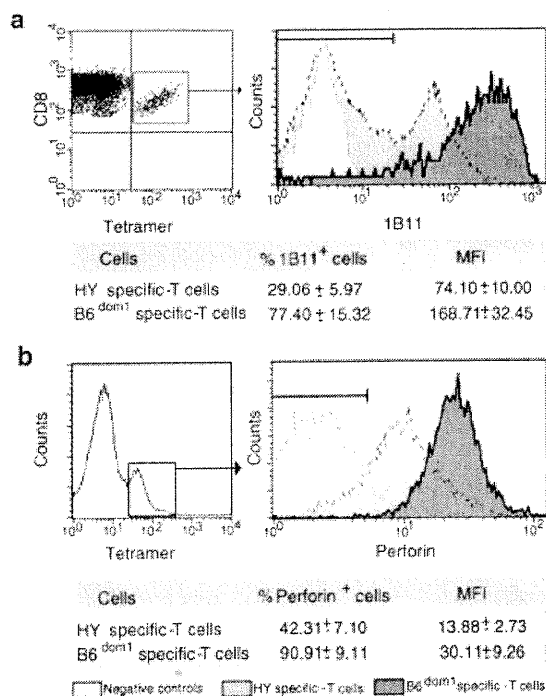


Fig. 4. Expression of cell surface O-glycan epitopes and intracellular perforin content. (a) Staining with 1B11 antibody was assessed on spleen tetramer⁺ cells 15 days after priming against HY (B10 female mice injected with B10 male cells), or B6^{dom1} (B10.H7^b male mice injected with B10 male cells). (b) Intracellular perforin staining. Splenocytes from mice primed against HY or B6^{dom1} (as in a) were incubated for 5 h with irradiated B10 male spleen cells expressing HY and B6^{dom1} antigens in culture medium supplemented with brefeldin A, then permeabilized with saponin, and stained with anti-perforin antibody. For both (a) and (b), flow cytometry data from one representative experiment are shown and the mean results ± SD of three experiments are presented. Splenocytes from unprimed mice served as negative controls.

cifically up-regulated on effector, as opposed to naïve and memory CTL [36]. Strikingly, when labeled with 1B11 antibody, the proportion of positive cells and the mean fluorescence intensity of 1B11⁺ cells were ~77%/168 U for B6^{dom1}-specific T cells, but only ~29%/74 U for HY-specific T cells. Furthermore, B6^{dom1}-specific T cells had a much higher intracellular perforin content than HY-specific T cells (Fig. 4). These data support the idea that the critical issue involved in immunodomination is a question of CTL function rather than CTL numbers. CTL that compete successfully for APC resources display superior effector function as evidenced by 1B11 labeling and perforin content.

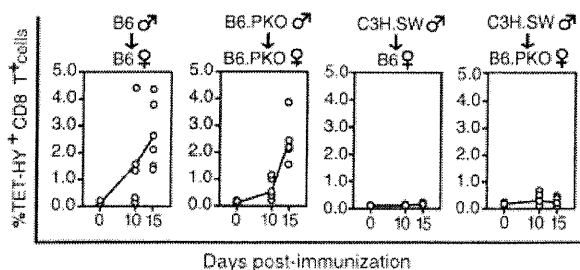


Fig. 5. Immunodomination prevails in perforin-deficient mice. Expansion of HY-tetramer⁺ CD8⁺ T cells when HY was presented alone (B6 male cells) or with numerous other MiHA (C3H.SW male cells) to wild-type (B6) or perforin-deficient (B6.PKO) female mice. Each dot represents one individual. Lines indicate the mean percentage of HY-tetramer⁺ cells at various times with three to six mice per group.

2.4 Immunodomination prevails in the absence of perforin-mediated killing

Given the evidence that perforin-mediated killing is the main though not the sole mechanism responsible for elimination of APC *in vivo* [19], and that CTL responsible for immunodomination show greater intracellular perforin content (Fig. 4), we evaluated whether immunodomination would disappear in the absence of perforin. Here, the underlying assumption is that by killing APC, CTL specific for immunodominant determinants might reduce the duration of antigen presentation below a critical threshold and consequently impede the generation of CTL responses toward non-dominant antigens. This would be consistent with reports showing that the duration and/or the level of proliferation of several antigen-reactive CTL is increased in perforin-deficient mice [37, 38]. To test our prediction we assessed expansion of HY-tetramer⁺ CD8⁺ T cells when HY was presented alone (B6 or B6.PKO male cells) or with numerous other MiHA (C3H.SW male cells) to either wild-type (B6) or perforin-deficient (B6.PKO) female mice. As expected, presentation of HY alone resulted in expansion of tetramer⁺ CD8⁺ T cells in both wild-type and perforin-deficient mice (Fig. 5). The key finding was that immunodomination was not abrogated in perforin-deficient animals: no HY-tetramer⁺ T cells were detected in wild-type and perforin-deficient mice primed with C3H.SW male cells. Thus, immunodomination cannot be accounted for solely on the basis of perforin-mediated killing of APC.

3 Discussion

Our model has two noteworthy features. CD8⁺ T cell responses were studied in naive mice with a normal T cell repertoire: they were not transgenic, and their T cell repertoire was not modified by passively transferred T cells. Besides, antigens used for priming were normal endogenous epitopes expressed at physiological levels: APC were not transgenic, transfected, or peptide-coated. Our relatively uncontrived model suggests several points. When two or more MHC class I-associated epitopes are found on the same APC, the presence of a single dominant antigen, B6^{dom1}, is sufficient to cause immunodomination. Yet B6^{dom1} itself is resistant to immunodomination when co-presented with more than 40 other epitopes. Immunodomination prevents expansion rather than differentiation of CD8⁺ T cells that recognize a non-dominant epitope, HY, and may be regulated by the CTL/APC ratio. Of special interest, the key difference between T cells that recognize B6^{dom1} and those recognizing HY is qualitative or functional rather than quantitative. The notable feature of T cells specific for B6^{dom1} is that they show striking up-regulation of molecules involved in CTL effector activity and not that they accumulate to particularly high levels (as assessed by tetramer staining).

One surprising finding was that, when immunodomination was precluded (Fig. 2 and 3), the rate of accumulation of HY-tetramer⁺ T cells was similar to that of B6^{dom1}-tetramer⁺ T cells. Thus, the dominant status of B6^{dom1} does not depend on an intrinsically higher proliferative activity of cognate CD8⁺ T cells. The crucial difference between HY- and B6^{dom1}-specific T cells seems somewhat related to their CTL effector activity estimated on the basis of two parameters: the expression of O-glycans recognized by 1B11 antibody and the intracellular perforin content. Compared with B6^{dom1}-tetramer⁺ T cells, HY-tetramer⁺ T cells can accumulate at similar levels, yet are defective in acquiring effector function. This observation is consistent with recent evidence that, although T cell proliferation and acquisition of effector function are often correlated, they are not mechanistically linked [30]. Supporting this idea, activated CD8⁺ T cells have been shown to vary in their lytic potential, a discrepancy determined by the nature of the epitope which they recognize [16, 28]. Thus, even though HIV-specific CD8⁺ T cells can be present at very high frequencies in HIV-infected subjects, these CTL remain crippled in terms of cytotoxic activity relative to CMV-specific CTL [29, 39]. Our study suggests that, aside from its impact on eradication of intracellular pathogens, development of effector function by CTL is responsible for immunodomination, and is thereby instrumental in shaping the repertoire of CTL responses. How does the

nature of a given epitope regulate the development of effector function in cognate CTL? Previous studies with B6^{dom1} provide evidence that epitope density may be a key determinant because of its influence on the efficiency of TCR triggering [15]. This contention is supported by the fact that, while B6^{dom1}/D^b complexes do not interact with their respective TCR with higher affinity than HY/D^b complexes, the former epitopes are much more abundant at the surface of APC: 1,000 versus 10 copies per cell for B6^{dom1} and HY, respectively [15].

The fact that immunodomination is abrogated when the quantity of antigen-bearing APC is increased suggests that its essence is competition for APC resources (Fig. 3). This is consistent with studies of Kedl et al. [24] in a model based on immunization of mice with peptide-coated dendritic cells and adoptive transfer of TCR transgenic OT1 T cells specific for the dominant K^b-associated ovalbumin peptide. These authors showed that injection of OT1 CD8⁺ T cells inhibited the response of host antigen-specific T cells to two ovalbumin-derived peptides, and that this inhibition could be overcome by the injection of large numbers of antigen-pulsed dendritic cells. Our work extends these results in a non-transgenic model in which mice with a normal T cell repertoire were confronted with endogenous epitopes expressed at physiological levels.

How does competition for APC resources lead to the selective expansion of CTL specific for dominant epitopes and to the neglect of non-dominant epitopes? We consider the following three observations. When immunodomination occurred, expansion of CTL that recognize HY was aborted and not merely delayed (Fig. 2). Immunodomination was prevented when APC were present in very high numbers (Fig. 3). CTL specific for B6^{dom1} displayed superior effector function (Fig. 4) but not a higher intrinsic proliferative potential (Fig. 3). These data argue against two proposed mechanisms for CTL competition which hinge on the assumption that CTL specific for dominant epitopes might simply monopolize access to the APC surface without impairing APC number or function [15, 24]. First, it has been conjectured that, because of more rapid or extensive expansion, CTL specific for dominant epitopes might simply outnumber other CTL at the APC surface [15, 18]. Clearly, the rate of expansion of CTL populations in our experiments was not consistent with the prediction that B6^{dom1}-specific CTL are endowed with a higher proliferative potential than their competitors. A second hypothesis was that by sticking to APC, CTL that recognize the dominant epitope could physically deny access by other CTL to the APC surface or to APC molecules recruited at the site of the immunological synapse [24]. However, it is hard to reconcile this premise with evidence that antigen-

specific naive T cells are rare, enter lymphoid organs asynchronously, and maintain vigorous migration upon cognate interactions with APC [40]. Since each T cell-APC encounter is short-lived, with a median duration between 6 and 12 min, it is difficult to imagine how CTL specific for a given epitope could monopolize access to the surface of antigen-bearing APC during a period of several days if the latter APC remain functional.

We surmise that to abort the priming of competitor CTL, B6^{dom1}-specific CTL must rapidly curtail the number or the function of antigen-bearing APC. In doing this, because of their superior effector activity, they reduce the time of interaction between competent APC and CTL below the duration threshold required to prime CTL that recognize non-dominant epitopes. First, this could be achieved by killing antigen-bearing APC. Supporting reports demonstrate that some [19, 41], but not all [24], CD4⁺ and CD8⁺ T cells rapidly eliminate antigen-bearing APC *in vivo*. One report [24] made use of exogenous peptide-coated APC where interactions with CTL apparently had no influence on the fate of APC. This approach may lead to an overestimation of APC survival since the half-life of peptide-MHC class I complexes at 37°C is usually a matter of a few hours [12, 15]. Notably, we showed that CTL specific for B6^{dom1} rapidly eliminate APC *in vivo*, whereas CTL specific for HY do not [19]. Our demonstration that B6^{dom1}-specific CTL are endowed with superior effector activity (Fig. 4) provides a cogent explanation for this discrepancy. Nevertheless, here we furnish conclusive evidence that perforin-mediated killing by itself is not required to cause immunodomination (Fig. 5). However, this observation should not be construed as a demonstration that immunodomination does not involve APC killing because other effector pathways such as involving ligands of the TNF family, might contribute to the rapid demise of antigen-bearing APC *in vivo* [19]. Second, CTL specific for a dominant epitope could, because of their high effector activity, rapidly lead to exhaustion of APC. This assumption is consistent with evidence that within 24 h after antigen presentation, naive CD8⁺ T cells are able to trigger dendritic cell maturation [42], a process that can rapidly lead to dendritic cell exhaustion within a few hours [43]. Demonstration that immunodomination is contingent on the rapid physical or functional demise of antigen-bearing APC will require identification of the molecular pathway(s) involved.

Regardless of whether it is caused by APC killing or APC exhaustion, the main consequence of immunodomination is to restrict the diversity of the repertoire of CTL responses. Deng et al. [13] raised the interesting possibility that the *raison d'être* of this limitation may be to lessen the risk of collateral autoimmune damage by

cross-reactive CTL. Collectively, our data suggest that immunodomination entails selective expansion of CTL with the best effector function, favoring quality over quantity.

4 Materials and methods

4.1 Mice

The following strains of mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and bred at the Guy-Bernier Research Center: C3H.SW, C57BL/6J (B6), C57BL/6-*Pfp^{tm1} A^{ap}* (B6.PKO), and C57BL/10J (B10). B10.C-*H7^b* (47N)/Sn (B10.H7^b) breeder mice were a kind gift of Dr. D. C. Roopenian (The Jackson Laboratory). Mice used between 6 and 16 weeks of age were maintained in specific pathogen-free conditions according to the standards of the Canadian Council on Animal Care.

4.2 Immunization and adoptive transfer

Mice were primed by i. p. injection of 2×10^7 spleen cells. In adoptive transfer experiments, spleen cell suspensions containing 5×10^6 CD8⁺ T cells were injected via the tail vein in irradiated (10 Gy) recipients.

4.3 Peptides

B6^{dom1} (AAPDNRETf) and HY (WMHHNMDLI) peptides were synthesized by the Sheldon Biotechnology Centre (Montreal, Canada). Purity, as determined by reversed phase-high performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis, was above 97%.

4.4 MHC class I/peptide tetramers

MHC class I (H2D^b)/peptide (B6^{dom1} or HY) tetramers were produced as previously described [44, 45]. Recombinant β 2-microglobulin and the extracellular domain of the MHC class I heavy chain containing the BirA recognition sequence in-frame at its C terminus were overexpressed in *Escherichia coli* as insoluble aggregates that formed inclusion bodies. Purified inclusion bodies were solubilized in urea, and monomeric H2D^b complexes were refolded around peptide by dilution of denaturing buffer. Monomeric complexes were recovered by anion exchange chromatography over a Mono Q HR column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). H2D^b/peptide complexes were biotinylated using BirA enzyme (Avidity, Denver, CO) as described [46]. Tetramers were generated by mixing the biotinylated monomeric complexes with NeutrAvidin-PE (Molecular Probes, Eugene, OR) at a 6:1 molar ratio. Then, biotinylated tetramers were purified by gel filtration over a Superdex 200 HR column (Pharmacia). Purified tetramers were stored at 1 mg/ml at 4°C and were fre-

quently tested on B6^{dom1}- and HY-specific T cell lines to document maintenance of staining capacity and signal intensity. B6^{dom1}- and HY-specific CD8⁺ T cell lines have been previously described [22, 23].

4.5 Cell staining and flow cytometry

Cell suspensions were stained with allophycocyanin-conjugated anti-CD8 antibody (PharMingen, Mississauga, Canada), sometimes with 1B11 antibody (PharMingen), in PBS/BSA 0.1% for 25 min at 4°C, washed, and then incubated with 1 μ g PE-labeled tetramers at 37°C for 40 min. TCR expression was monitored for antigen-specific T cell lines with FITC-conjugated anti-TCR $\alpha\beta$ antibody (PharMingen). Cells were analyzed on a FACSCaliburTM (Becton Dickinson, Mountain View, CA) using CellQuestTM software. Intracellular perforin labeling was performed as previously described [47]. Briefly, splenocytes from mice primed *in vivo* against either B6^{dom1} or HY were incubated for 5 h with irradiated B10 male spleen cells in culture medium supplemented with 2 μ g/ml brefeldin A (Sigma, Oakville, Canada), washed and permeabilized with 0.1% saponin (Sigma), and stained with anti-perforin antibody (clone KM585; Kamiya Biomedical, Seattle, WA) [29]. Results for group means were compared using Student's *t*-test.

Acknowledgements: We thank Dr. R. P. Sékaly for the gift of plasmid clones, Dr. J. D. Altman for advice on the preparation of H2D^b-peptide tetramers, Drs. N. Labrecque and P. Santamaria for thoughtful review of the manuscript and Ms. J. Kashul for editorial assistance. Grant 011189 from the National Cancer Institute of Canada supported this work.

References

- 1 Zinkernagel, R. M., Immunology taught by viruses. *Science* 1996. **271**: 173–178.
- 2 Brodsky, F. M., Lem, L., Solache, A. and Bennett, E. M., Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunol. Rev.* 1999. **168**: 199–215.
- 3 Harty, J. T., Tvinnereim, A. R. and White, D. W., CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 2000. **18**: 275–308.
- 4 Weidt, G., Utermöhlen, O., Heukeshoven, J., Lehmann-Grube, F. and Deppert, W., Relationship among immunodominance of single CD8⁺ T cell epitopes, virus load, and kinetics of primary antiviral CTL response. *J. Immunol.* 1998. **160**: 2923–2931.
- 5 Yewdell, J. W. and Bennink, J. R., Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1999. **17**: 51–88.
- 6 Wallace, M. E., Keating, R., Heath, W. R. and Carbone, F. R., The cytotoxic T cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. *J. Virol.* 1999. **73**: 7619–7626.

- 7 Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M. S., Peffer, N., Meyers, H., Nelson, J. A., Gairin, J. E., Hahn, B. H., Oldstone, M. B. and Shaw, G. M., Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* 1997. **3**: 205–211.
- 8 Goulder, P. J., Phillips, R. E., Colbert, R. A., McAdam, S., Ogg, G., Nowak, M. A., Giangrande, P., Luzzi, G., Morgan, B., Edwards, A., McMichael, A. J. and Rowland-Jones, S., Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* 1997. **3**: 212–217.
- 9 Klenerman, P. and Zinkernagel, R. M., Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature* 1998. **394**: 482–485.
- 10 Wang, H. and Eckels, D. D., Mutations in immunodominant T cell epitopes derived from the nonstructural 3 protein of hepatitis C virus have the potential for generating escape variants that may have important consequences for T cell recognition. *J. Immunol.* 1999. **162**: 4177–4183.
- 11 Price, G. E., Ou, R., Jiang, H., Huang, L. and Moskophidis, D., Viral escape by selection of cytotoxic T cell resistant variants in influenza A virus pneumonia. *J. Exp. Med.* 2000. **191**: 1853–1867.
- 12 Pion, S., Fontaine, P., Desaulniers, M., Jutras, J., Filep, J. G. and Perreault, C., On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 1997. **27**: 421–430.
- 13 Deng, Y., Yewdell, J. W., Eisenlohr, L. C. and Bennink, J. R., MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J. Immunol.* 1997. **158**: 1507–1515.
- 14 Perreault, C., Roy, D. C. and Fortin, C., Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol. Today* 1998. **19**: 69–74.
- 15 Pion, S., Christianson, G. J., Fontaine, P., Roopenian, D. C. and Perreault, C., Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens. *Blood* 1999. **93**: 952–962.
- 16 Chen, W., Anton, L. C., Bennink, J. R. and Yewdell, J. W., Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 2000. **12**: 83–93.
- 17 Wolpert, E. Z., Grufman, P., Sandberg, J. K., Tegnesjö, A. and Kärre, K., Immunodominance in the CTL response against minor histocompatibility antigens: interference between responding T cells, rather than with presentation of epitopes. *J. Immunol.* 1998. **161**: 4499–4505.
- 18 Perreault, C., Pion, S. and Roy, D. C., Mechanisms and implications of immunodominance. In Roopenian, D. and Simpson, E. (Eds.) *Minor histocompatibility antigens: from the laboratory to the clinic*. Landes Bioscience, Georgetown 2000, pp 71–78.
- 19 Loyer, V., Fontaine, P., Pion, S., Héту, F., Roy, D. C. and Perreault, C., The *in vivo* fate of APC displaying minor H antigens and/or MHC differences is regulated by CTL specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J. Immunol.* 1999. **163**: 6462–6467.
- 20 Wettstein, P. J., Immunodominance in the T cell response to multiple non-H-2 histocompatibility antigens. III. Single histocompatibility antigens dominate the male antigen. *J. Immunol.* 1986. **137**: 2073–2079.
- 21 Perreault, C., Jutras, J., Roy, D. C., Filep, J. G. and Brochu, S., Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 1996. **98**: 622–628.
- 22 Greenfield, A., Scott, D., Pennisi, D., Ehrmann, I., Ellis, P., Cooper, L., Simpson, E. and Koopman, P., An H-YDb epitope is encoded by a novel mouse Y chromosome gene. *Nat. Genet.* 1996. **14**: 474–478.
- 23 Eden, P. A., Christianson, G. J., Fontaine, P., Wettstein, P. J., Perreault, C. and Roopenian, D. C., Biochemical and immunogenetic analysis of an immunodominant peptide (B^{6dom1}) encoded by the classical H7 minor histocompatibility locus. *J. Immunol.* 1999. **162**: 4502–4510.
- 24 Kedl, R. M., Rees, W. A., Hildeman, D. A., Schaefer, B., Mitchell, T., Kappler, J. and Marrack, P., T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 2000. **192**: 1105–1114.
- 25 Bachmann, M. F., Sebзда, E., Kundig, T. M., Shahinian, A., Speiser, D. E., Mak, T. W. and Ohashi, P. S., T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. *Eur. J. Immunol.* 1996. **26**: 2017–2022.
- 26 Bachmann, M. F., Oxenius, A., Speiser, D. E., Mariathasan, S., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. and Ohashi, P. S., Peptide-induced T cell receptor down-regulation on naive T cells predicts agonist/partial agonist properties and strictly correlates with T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 1997. **27**: 2195–2203.
- 27 Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. D., Suresh, M., Altman, J. D. and Ahmed, R., Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 2205–2213.
- 28 Spencer, J. V. and Braciale, T. J., Incomplete CD8⁺ T lymphocyte differentiation as a mechanism for subdominant cytotoxic T lymphocyte responses to a viral antigen. *J. Exp. Med.* 2000. **191**: 1687–1698.
- 29 Appay, V., Nixon, D. F., Donahoe, S. M., Gillespie, G. M., Dong, T., King, A., Ogg, G. S., Spiegel, H. M., Conlon, C., Spina, C. A., Havlir, D. V., Richman, D. D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A. J. and Rowland-Jones, S. L., HIV-specific CD8⁺ T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* 2000. **192**: 63–76.
- 30 Laouar, Y. and Crispe, I. N., Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4⁺ T cell proliferation and effector function *in vivo*. *Immunity* 2000. **13**: 291–301.
- 31 Griem, P., Wallny, H. J., Falk, K., Rotzschke, O., Arnold, B., Schonrich, G., Hammerling, G. and Rammensee, H. G., Uneven tissue distribution of minor histocompatibility proteins versus peptides is caused by MHC expression. *Cell* 1991. **65**: 633–640.
- 32 Lenz, L. L., Butz, E. A. and Bevan, M. J., Requirements for bone marrow-derived antigen-presenting cells in priming cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* 2000. **192**: 1135–1142.
- 33 Sigal, L. J. and Rock, K. L., Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation. *J. Exp. Med.* 2000. **192**: 1143–1150.
- 34 Tomlinson Jones, A., Federspiel, B., Ellies, L. G., Williams, M. J., Burgener, R., Duronio, V., Smith, C. A., Takei, F. and Ziltener, H. J., Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. *J. Immunol.* 1994. **153**: 3426–3439.

- 35 **Carlow, D. A., Ardman, B. and Ziltener, H. J.**, A novel CD8 T cell-restricted CD45RB epitope shared by CD43 is differentially affected by glycosylation. *J. Immunol.* 1999. **163**: 1441–1448.
- 36 **Harrington, L. E., Galvan, M., Baum, L. G., Altman, J. D. and Ahmed, R.**, Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J. Exp. Med.* 2000. **191**: 1241–1246.
- 37 **Spaner, D., Raju, K., Rabinovich, B. and Miller, R. G.**, A role for perforin in activation-induced T cell death *in vivo*: increased expansion of allogeneic perforin-deficient T cells in SCID mice. *J. Immunol.* 1999. **162**: 1192–1199.
- 38 **Badovinac, V. P., Tinnereim, A. R. and Harty, J. T.**, Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon- γ . *Science* 2000. **290**: 1354–1357.
- 39 **Gea-Banacloche, J. C., Migueles, S. A., Martino, L., Shupert, W. L., McNeil, A. C., Sabbaghian, M. S., Ehler, L., Prussin, C., Stevens, R., Lambert, L., Altman, J., Hallahan, C. W., de Quiros, J. C. L. B. and Connors, M.**, Maintenance of large numbers of virus-specific CD8⁺ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J. Immunol.* 2000. **165**: 1082–1092.
- 40 **Gunzer, M., Schäfer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zänker, K. S., Bröcker, E. B., Kämpgen, E. and Friedl, P.**, Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 2000. **13**: 323–332.
- 41 **Ingulli, E., Mondino, A., Khoruts, A. and Jenkins, M. K.**, *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1997. **185**: 2133–2141.
- 42 **Ruedl, C., Kopf, M. and Bachmann, M. F.**, CD8⁺ T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 1999. **189**: 1875–1884.
- 43 **Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F.**, Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 2000. **1**: 311–316.
- 44 **Altman, J. D., Moss, P. H., Goulder, P. R., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. and Davis, M. M.**, Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996. **274**: 94–96.
- 45 **Gallimore, A., Glithero, A., Godkin, A., Tissot, A. C., Pluckthun, A., Elliott, T., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.**, Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *J. Exp. Med.* 1998. **187**: 1383–1393.
- 46 **Crawford, F., Kozono, H., White, J., Marrack, P. and Kappler, J.**, Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide complexes. *Immunity* 1998. **8**: 675–682.
- 47 **Slifka, M. K., Rodriguez, F. and Whitton, J. L.**, Rapid on/off cycling of cytokine production by virus-specific CD8⁺ T cells. *Nature* 1999. **401**: 76–79.
- 48 **Bailey, D. W.**, Four approaches to estimating number of histocompatibility loci. *Transplant. Proc.* 1970. **2**: 32–38.
- 49 **Loveland, B. and Simpson, E.**, The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor. *Immunol. Today* 1986. **7**: 223–229.

Correspondence: Claude Perreault, Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 de l'Assomption Blvd., Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4
Fax: +1-514-252-3430
e-mail: c.perreault@videotron.ca