

Université de Montréal

Développement d'un nouvel outil permettant la détection des lymphocytes T
CD4⁺ par l'expression de CMH de classe II en surface de levures

Par
Luc English

11476485

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

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

Juillet 2003

© Luc English, 2003



W

4

U58

2003

V. 164

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Développement d'un nouvel outil permettant la détection des lymphocytes T
CD4⁺ par l'expression de CMH de classe II en surface de levures

Présenté par:

Luc English

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Hugo Soudeyns	président du jury
Dr Walid Mourad	membre du jury
Dr Jacques Thibodeau	Co-directeur de recherche
Dr Rafick-Pierre Sékaly	Directeur de recherche

Mémoire accepté le :

Résumé

La reconnaissance d'antigènes, qu'ils soient endogènes ou exogènes à l'organisme, constitue l'étape clef dans le développement de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Cette réponse est amorcée lorsque le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), servant à la présentation des antigènes, est reconnu par le récepteur T (TCR), présent à la surface des lymphocytes T. Compte tenu de l'importance de la spécificité du TCR dans la réponse immunitaire, plusieurs techniques d'études permettant une analyse très spécifique des lymphocytes T ont été développées afin de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents au développement et au maintien de la réponse immunitaire. Le développement récent de nouveaux outils, notamment les molécules dimériques et tétramériques de CMH, ont ouvert la voie à des techniques quantitatives permettant l'étude phénotypique des lymphocytes T quel que soit leur niveau de fonctionnalité. C'est la production de CMH sous forme multimérique qui a permis d'augmenter l'avidité des CMH pour le TCR rendant alors possible des analyses lymphocytaires en cytométrie de flux. Bien que ces outils soient tout à fait efficaces pour détecter les lymphocytes T spécifiques d'un épitope, leur utilisation est néanmoins restreinte par la nécessité de connaître cet épitope. Par conséquent, le développement d'un outil permettant à la fois l'identification de lymphocytes T spécifiques et l'identification de nouveaux épitopes constituerait une technologie très versatile dans le domaine de l'immunologie.

L'outil développé dans cette étude constitue une nouvelle forme multimérique de CMH qui contient plus de 10 000 molécules de CMH comparativement à quatre dans le cas de tétramères par exemple. Grâce à ce nombre élevé de molécules pouvant être exprimées à la surface des levures *S. cerevisiae* cet outil pourra servir à l'identification de TCR de très faibles affinité. Nos données prouvent qu'il est possible d'exprimer à la surface de levures des complexes peptide-CMH de classe II humain en

fusion avec le récepteur de surface α -agglutinine. Le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ de l'influenza a été utilisé comme modèle dans cette étude afin de démontrer la spécificité et l'efficacité du système généré pour identifier une lignée cellulaire spécifique au peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ présenté dans le contexte des molécules HLA-DR β 0101.

La spécificité des interactions observées entre les levures exprimant en surface des complexes HA-HLA-DR β 0101 et la lignée cellulaire spécifique au peptide HA a été confirmée par une compétition à l'aide d'anticorps dirigés contre le TCR ou le co-récepteur CD4⁺. Suite à la compétition avec les anticorps, une inhibition de la formation de conjugué entre les levures et les lymphocytes a été observée ramenant le niveau d'interaction similaire au bruit de fond.

Ces résultats préliminaires obtenus confirment la validité du système d'expression de CMH de classe II en surface de levures pour le développement d'un outil hautement versatile et de haute affinité pour l'identification de lymphocytes T. Cependant, le système devra être optimisé afin d'augmenter le niveau d'expression de CMH de classe II bien repliés à la surface des levures. Cette optimisation des molécules CMH permettra à la fois une meilleure reproductibilité entre les analyses et une meilleure discrimination entre des populations cellulaires mixtes.

Mots clés: Antigène, hémagglutinine, multimère, épitope, immunitaire, récepteur T, influenza.

Résumé (anglais)

Recent advances in the capability to detect antigen-specific T cells have been a key factor in our understanding of cellular immune response. Major histocompatibility complex (MHC) multimer technology offers a powerful tool for direct identification of antigen-specific T cells. However, the problems of low CD4⁺ T cells frequency and TCR avidity found with MHC class II multimer technologies has almost blocked the progress of MHC class II multimer applications. Development of multimeric forms of MHC allowing higher density of MHC molecules will constitute a useful tool in the detection of low affinity CD4⁺ T cells. Here, we show that yeast cells can be used to express human MHC class II molecules to generate multimeric forms of MHC. Out of four constructs encoding for the MHC class II molecule with a covalently linked HA peptide, two constructs were expressed and detected on the surface yeast cells by flow cytometry and by microscopy using different conformation-specific anti-MHC class II antibodies (L243 and LB 3.1). In addition, the PKH26 labeled-yeasts expressing HLA-DR1 molecules loaded with HA peptide have proved to be an effective, though suboptimal, way to analyze TCR specificity by flow cytometry. The proof of concept of this approach was demonstrated using a T cell line specific for the HA peptide bound to HLA-DR1 molecules. Moreover, the interaction observed between T cells and yeast was inhibited by pre-incubating HA specific T cells either with an anti-TCR or an anti-CD4 antibody. Despite the successful visualization of antigen-specific T cells, activation of HA specific CD4⁺ T cell line could not be demonstrated. Our results indicate that the yeast display system can be used to express MHC molecule with covalently linked peptide as a direct tool for probing T-cells and for selecting TCR ligands from genetic libraries encoding randomized peptides.

Key words: Antigen, hemagglutinin, multimer, epitope, immune, T cell receptor, influenza.

Table des matières

Page Titre	i
Page d'identification du jury.....	ii
Résumé (français)	iii
Résumé (anglais)	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures	xi
Liste des annexes.....	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements	xvi

Chapitre I 1

Introduction 2

1. Le complexe majeur d'histocompatibilité	2
1.1. Le CMH de classe II	2
1.2. Polymorphisme génétique	3
1.3 Polymorphisme et poche peptidique.....	4
1.4 Nomenclature	5
1.5 Structure des molécules de classe II	5
1.6 Apprêtement et présentation des antigènes	6
2. Interaction CMH de classe II et peptide.....	7
2.1 Type de liaison	8

2.2 Poches et motifs d'ancrage	8
2.3 Taille et spécificité du peptide.....	10
3. Liaison CMH de classe II et lymphocytes T CD4+.....	11
3.1 Synapse immunologique	13
3.2 Le co-récepteur CD4	15
4. Méthodes d'étude qualitatives de la réponse lymphocytaire	16
4.1 Production de cytokines.....	16
4.1.1 Elispot	17
4.1.2 Marquage de cytokines intracellulaires	17
4.2 Prolifération cellulaire	18
5. Méthodes d'étude quantitatives de la réponse immunitaire.....	19
5.1 Monomères de CMH.....	21
5.2 Dimères de CMH	22
5.3 Tétramères de CMH	23
5.4 Multimères de CMH.....	25
5.4.1 Multimère divers	26
5.4.2 Liposomes.....	26
5.4.3 Expression de CMH en bactériophages	27
5.4.4 Expression de CMH en surface de levures	28
6. Introduction au projet et objectif du travail	30
6.1. But et méthodologie	32
Chapitre II.....	34
7. Title	35
7.1 Abstract.....	36
7.2 Introduction	37
7.3 Material et methods	40

7.3.1 MHC construct.....	40
7.3.2 Cell culture.....	42
7.3.3 Transformation of <i>S. cerevisiae</i>	42
7.3.4 Induction of the fusion protein.....	43
7.3.5 Antibodies used for MHC detection	43
7.3.6 Immunofluorescence and Flow Cytometry.....	44
7.3.7 Western Blot	44
7.3.8 In vitro conjugated formation	45
7.4 Results and discussion.....	46
7.4.1 MHC class II constructs for yeast display	46
7.4.2 MHC class II display analysis	47
7.4.3 Biochemical analysis of MHC class II fusion proteins.....	48
7.4.4 Specific interactions between yeast expressing HA-MHC class II and T cells.....	49
7.4.5 Inhibition of interactions by CD4 and TCR specific antibodies	50
7.4.6 Concluding Remarks	52
7.4.7 Acknowledgements.....	52
7.5 References	53
7.6 Figure legends.....	61
7.7 Figures.....	63
Chapitre III.....	67
8. Discussion	68
8.1 Constructions	68
8.2 Vecteurs	70
8.3 Systèmes d'expression.....	73
8.3.1 Bactéries	73
8.3.2 Bactériophages	73

8.3.3 Levures	74
8.4 Expression des CMH de classe II en surface de levures....	76
8.5 Interaction entre les levures-CMH et les lymphocytes T.....	77
8.6 Colorants	79
8.7 Analyse.....	79
8.8. Conclusion générale	81
9. Références	82
Annexes	xvii

Liste des Tableaux

Tableau I. Liste des gènes et des allèles codant pour les molécules de classe II.3

Tableau II. Caractéristiques de différentes méthodes utilisées pour l'identification et la caractérisation des lymphocytes T.29

Liste des Figures

- Figure 1.** Organisation génomique de la région codant pour les molécules de CMH de classe II humain.2
- Figure 2.** Schéma représentant le polymorphisme de la région HLA-DR. ...4
- Figure 3.** Structure des molécules HLA-DR β 1 couplées au peptide HA de l'influenza6
- Figure 4.** Sites de liaison du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ à la molécule HLA-DR1.....10
- Figure 5.** Sites de liaison entre le TCR et le complexe peptide-CMH de classe II 13
- Figure 6.** Sites de liaison de la molécule CD4 à la molécule de CMH de classe II. 15
- Figure 7.** Représentation schématique des différentes formes de molécules multimériques de CMH.20
- Figure 8.** Molécule HLA-DR0101 liant de façon covalente le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ par un linker flexible de 15 acides aminés.24
- Figure 9.** MHC class II single chain construct cloned into the pYD1 yeast display vector.....63
- Figure 10.** Evaluation of recombinant peptide-MHC expression on yeast surface.....64

Figure 11. Staining of Jurkat T cells by yeast expressing HA-MHC class II molecules.65

Figure 12. Inhibition of Yeast-Jurkat conjugate formation by antibody competition.66

Liste des Annexes

Annexe 1: Fréquence des haplotypes HLA-DR dans la population nord américaine et française.xvi

Annexe 2: Vecteur d'expression en levure pYD1.xvii

Annexe 3: Sites de mutations retrouvés chez les levures exprimant des CMH de classe II murin conformationnels après mutagenèse aléatoire....xviii

Annexe 4: Production en *E. coli* de molécules recombinantes du CMH de classe II HLA-DR β 0101 exprimant un peptide lié de façon covalente.xix

Liste des abréviations

ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
Aga2p	sous-unité 2 de l' α -agglutinine
BSA	Bovine Serum albumin
CD4	Cluster of differentiation 4
CFSE	5-(and-6-)-CarboxyFluorescein diacetate, Succinimidyl Ester
CLIP	Class II associated invariant chain peptide
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CO ₂	Dioxyde de carbone
cSMAC	Central SupraMolecular Activation clusters
pSMAC	Peripheral SupraMolecular Activation clusters
°C	Degré Celsius
D.O ₆₀₀	Densité optique à 600 nm
EDTA	Disodium ÉthylèneDiaminetétra-Acétate dihydrate
ELISA	Enzyme linked immonoSorbent assay
ELISPOT	Elisa Spot
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein Iso Thio-cyanate
GPI	Glycosylphosphatidyl-inositol
HA	Hémagglutinine A
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSP	Heat shock protein
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
IFN- γ	InterFéroN- γ
IgG	Immunoglobuline de type G
KDa	kiloDalton
LFA-1	Leucocyte Function-associated Antigen-1
mAb	Monoclonal Antibody
min	Minutes

Pb	Paire de base
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase chain Reaction
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TCR	T cell Receptor

Remerciement

Je remercie le Dr Rafick-Pierre Sékaly de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet ambitieux et stimulant. Je tiens également à remercier mon codirecteur de recherche le Dr Jacques Thibodeau pour son soutien et son aide tout au long de ma maîtrise.

Je remercie toutes les personnes qui ont de près ou de loin participé à ce projet notamment: le Dr Bader Yassine-Diab, Gaëlle Breton, Alain Dumont, Lena Kalfayan, Kim Ellefsen, Anne-Elen Kernaleguen, Dr Martin Bourbonnière, Dr André Darveau, Younes Chouikh, Ian Gael Rodrigue Gervais et Souheil Younes. Finalement, je remercie l'ensemble des collègues de travail pour les bons moments passés ensemble.

Chapitre I

Introduction

INTRODUCTION

1. Le complexe majeur d'histocompatibilité

Le CMH humain est situé sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3). On retrouve, du centromère vers le télomère, trois régions qui correspondent aux gènes du CMH de classe II, III et I. La région du CMH de classe I code pour les molécules classiques du CMH de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) et code également pour les molécules dites non-classiques. (HLA-E, HLA-F et HLA-G). La région du CMH classe III est constituée de plusieurs types de gènes dont certains du complément, d'autres du facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α) ainsi que ceux codant pour des protéines de choc thermique (HSP).

1.1 Le CMH de classe II

Le locus des gènes du CMH de classe II (HLA-D) est constitué de trois isoformes de classe II soient: HLA-DP, HLA-DQ et HLA-DR. Cette région du chromosome code également pour plusieurs autres molécules jouant un rôle important dans le processus de présentation antigénique dont HLA-DM, HLA-DO, TAP et LMP.^{1,2}

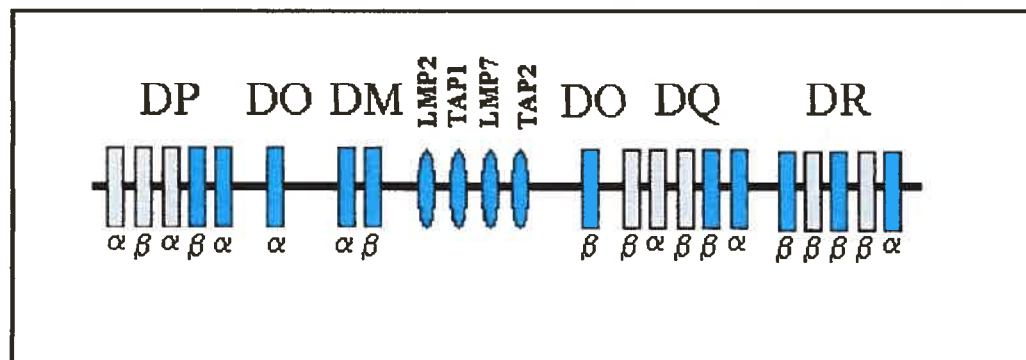


Figure 1: Organisation génomique de la région codant pour les molécules de CMH de classe II humaine. Les pseudogènes sont représentés en gris et les gènes codant en bleu. Adapté de Kumanovics et al.²

1.2 Polymorphisme génétique

Les molécules du CMH de classe II résultent de l'association de deux chaînes glycoprotéiques provenant de deux gènes très polymorphes, les gènes α et β . Comme toutes les chaînes glycoprotéiques sont représentées en grande partie par plusieurs allèles, un grand polymorphisme en résulte. On dénombre plus de 611 allèles pour les molécules de classe II.³ Contrairement aux molécules HLA-DP et HLA-DQ qui sont codées par un seul gène β et un seul gène α , les molécules HLA-DR sont codées par neuf gènes β et un gène α . (Tableau I)

Tableau I. Nombre d'allèles répertoriés des différents gènes codant pour les molécules de CMH de classe II humain.

Gènes DR	Nombre d'allèles	Gène DP	Nombre d'allèles	Gène DQ	Nombre d'allèles
DR β 1	315	DP α	20	DQ α	22
DR β 2	1	DP β	99	DQ β	53
DR β 3	38				
DR β 4	12				
DR β 5	15				
DR β 6	3				
DR β 7	2				
DR β 8	1				
DR β 9	1				
DR α 1	3				

Adapté de Albert *et al.*³

Il faut cependant noter que seuls les gènes HLA-DRB1, DRB3, DRB4 et DRB5 sont fonctionnels et ils sont regroupés en cinq haplotypes soit: DR1, DR51, DR52, DR53 et DR8 (Figure 2). Le gène DR β 1 et le gène DR α

sont présents quel que soit l'haplotype. Les groupes DR1 et DR8 codent pour un seul type de molécule HLA-DR alors que les groupes DR51, DR52 et DR53 codent pour deux types de molécules HLA-DR. L'expression des CMH est co-dominante ainsi, en fonction de leurs haplotypes, certaines personnes peuvent exprimer jusqu'à huit molécules différentes de CMH de classe II (deux de HLA-DP, deux de HLA-DQ et de deux à quatre molécules HLA-DR). De plus, il est possible d'observer des appariements inter-isotypiques par exemple, entre les chaînes α HLA-DR et les chaînes β HLA-DQ augmentant ainsi le répertoire des molécules de CMH de classe II.^{4;5}

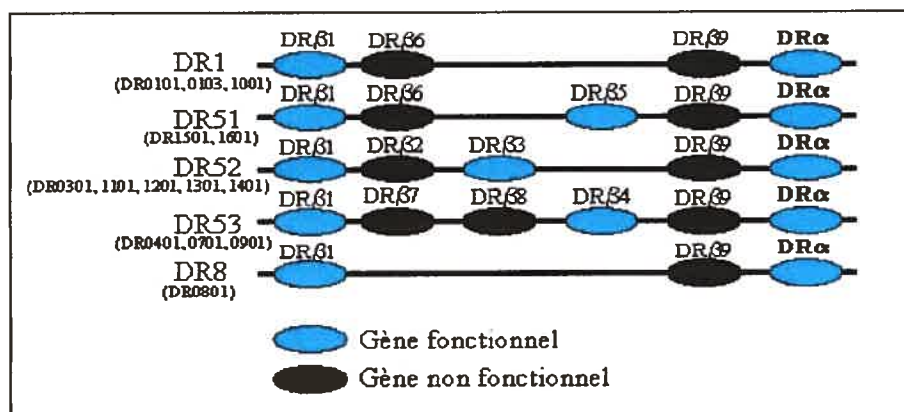


Figure 2. Schéma représentant le polymorphisme de la région HLA-DR. Le locus DR code pour une seule chaîne α et pour une ou deux chaînes β selon l'haplotype. En bleu, on retrouve les gènes fonctionnels et en noir les pseudogènes.

1.3 Polymorphisme et poche peptidique

Le grand polymorphisme entre les différents allèles du CMH de classe II se retrouve principalement dans les domaines α 1 et β 1 des molécules de CMH. Ceci s'explique par le fait que ce sont ces domaines, α 1 et β 1, qui constituent la poche peptidique. Les variations retrouvées d'un allèle à l'autre sont donc principalement localisées au fond de la niche peptidique et sur les hélices α qui bordent cette poche.⁶ Dans le cas de la

molécule HLA-DR, les variations retrouvées entre les différents allèles de la chaîne α sont localisées au niveau du domaine cytoplasmique (leucine/valine en position 217) et n'ont donc aucune influence sur la liaison peptidique.⁷ De ce fait, on considère donc que la chaîne α est monomorphe. Par conséquent, l'expression du gène HLA-DR β 1 (Figure 2) quel que soit l'haplotype de l'individu et son association avec la chaîne unique HLA-DR α , permet, avec seulement quelques allèles différents du gène HLA-DR β 1, de couvrir pratiquement l'ensemble de la population. (Annexe 1)

1.4 Nomenclature

Pour les molécules HLA-DR, comme le polymorphisme provient seulement de la chaîne β on ne mentionne pas la chaîne α , par exemple HLA-DR β 1*0101 alors que pour les molécules HLA-DP et HLA-DQ, on doit faire mention des deux chaînes, par exemple HLA-DP (α 1*0501, β 1*0201).

1.5 Structure des molécules de CMH de classe II

Les molécules de CMH de classe II sont des hétérodimères constituées de deux protéines transmembranaires glycosylées. La chaîne α , d'environ 32 kDa avec deux sites de glycosylation, est plus glycosylée que la chaîne β qui est d'environ 29 kDa et possédant un seul site de glycosylation. Les deux chaînes comportent quatre domaines soit: un domaine intracellulaire de 12-15 acides aminés en carboxy terminal, un domaine hydrophobe pour la région transmembranaire d'environ 30 acides aminés et deux domaines extracellulaires, d'environ 90 acides aminés, α 1 et α 2 ou β 1 et β 2 pour la chaîne α et β respectivement. Les domaines α 2 et β 2, situés près de la membrane du côté extracellulaire ont une structure similaire à des domaines d'immunoglobulines. Ce sont les domaines α 1 et β 1, situés à l'extrémité N-terminal, qui forment le site de fixation du peptide antigénique.⁸

Les flancs du site peptidique sont délimités par deux hélices α anti-parallèles et le plancher est composé de huit feuilletts β .⁹⁻¹² L'association entre les deux chaînes est maintenue par des liaisons non covalentes et des ponts disulfures assurent l'intégrité de la structure des chaînes α et β .⁸

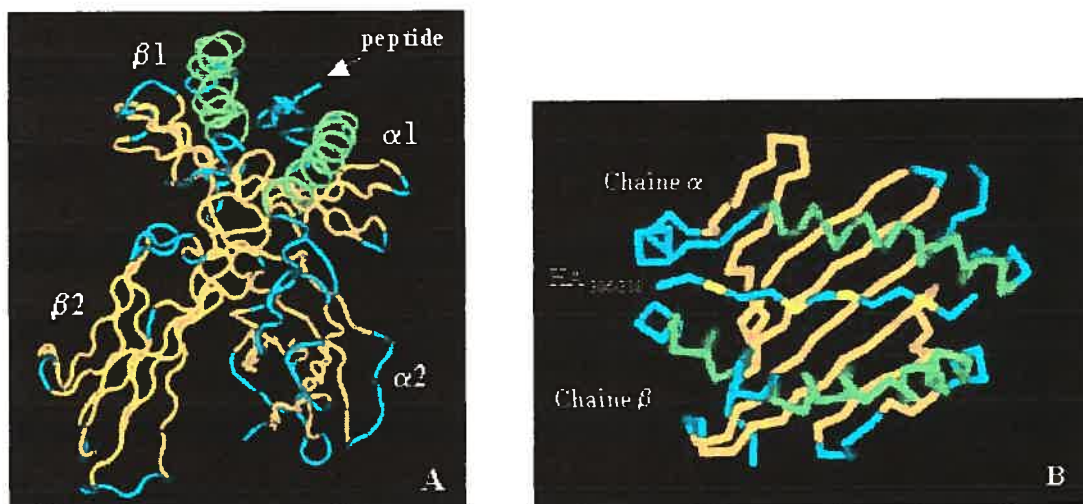


Figure 3. Structure des molécules HLA-DR β 1 couplées au peptide HA de l'influenza. On retrouve en **A** la molécule HLA-DR vue de coté avec ses deux hélices α en vert délimitant la niche peptidique. Vue de dessus en **B**, on retrouve en orange les feuilletts β constituant le plancher de la niche peptidique.¹³

1.6 Apprêtement et présentation des antigènes¹⁴

Les deux chaînes α et β , nouvellement synthétisées, vont s'associer à la chaîne invariante (Ii) au niveau du réticulum endoplasmique pour former un complexe nonamérique $(\alpha\beta)_3Ii_3$. Le rôle de la chaîne invariante est double; elle inhibe temporairement toute fixation peptidique sur la molécule de CMH et dirige en plus le complexe CMH-Ii vers les endosomes¹⁵ où cette dernière sera dégradée par des protéases spécifiques telles que les cathepsines. Seul un fragment de la chaîne invariante reste dans la poche peptidique, ce fragment est communément appelé CLIP (classe II associated invariant chain peptide). Le changement du CLIP par un peptide

antigénique est modulé par les molécules HLA-DM. Selon le modèle "shoulder to shoulder",^{14;16;17} l'interaction entre HLA-DR et HLA-DM permet la relâche du CLIP donnant ainsi la possibilité aux peptides antigéniques de s'associer avec la molécule HLA-DR. L'activité de HLA-DM serait contrôlée, dans les lymphocytes B, par les molécules HLA-DO. L'activité de HLA-DO étant optimale à pH 6, cette molécule inhibe la fixation des peptides dans les endosomes naissants. À des pH plus acides comme ceux retrouvés dans les endosomes matures, ce sont les molécules HLA-DM qui sont les plus actives. Cette modulation de HLA-DM par HLA-DO permet de modifier le répertoire des peptides antigéniques présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).¹⁸⁻²³

Contrairement aux molécules du CMH de classe I qui sont exprimées de façon ubiquitaire à la surface de toutes les cellules nucléées, peu de cellules vont exprimer des CMH de classe II. En fait, seulement quelques cellules spécialisées dans la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4+ expriment des CMH de classes II. Parmi ces cellules, on retrouve les lymphocytes B, les monocytes-macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T activés. De plus, certaines cellules d'origine épithéliale expriment également du CMH de classe II. Le niveau d'expression de ces molécules de CMH est induit par différents facteurs dont l'interféron- γ et le TNF- α . Le nombre de molécules exprimées à la surface d'un lymphocyte B est d'environ 10^4 - 10^6 .^{24;25}

2. Interaction entre le CMH de classe II et le peptide

Plusieurs techniques ont été développées pour permettre d'étudier la spécificité de fixation des peptides antigéniques sur les molécules de classe II. Parmi ces techniques, citons l'élution de peptides naturels de la surface des CPA, l'expression de peptide à la surface de phages et la cristallographie aux rayons X. Grâce à ces travaux, notamment ceux de Hammer²⁶⁻³⁶ et Rammensee,³⁷⁻³⁹ plusieurs programmes informatiques

utilisant des algorithmes permettent de prédire, avec une efficacité relative, les épitopes possédant une affinité suffisamment grande pour lier un ou plusieurs allèles de CMH. Bien que ce type de logiciel soit de plus en plus utilisé pour prédire les interactions possibles entre un épitope X et une ou plusieurs molécules de CMH, aucune information ne permet de prédire si l'épitope sélectionné peut être apprêté et présenté de façon naturelle à la surface cellulaire.

2.1 Type de liaison

Les études cristallographiques aux rayons X avec la molécule HLA-DR0101 et le peptide HA de l'hémagglutine A d'influenza (306-318) démontrent que le site de fixation du peptide est ouvert des deux côtés et que le peptide HA forme de nombreuses liaisons hydrogènes avec la molécule de CMH de classe II. Des 15 liaisons formées, plus de douze liaisons se retrouvent entre des résidus conservés dans toutes les molécules de classe II et des résidus des chaînes latérales du peptide. Ces liaisons, communes à tous les allèles, sont donc considérées comme non spécifiques. Cependant, les trois autres liaisons se retrouvent entre les chaînes latérales du peptide HA et les résidus polymorphes de la molécule de classe II. On considère donc ces liaisons comme étant spécifiques.⁴⁰

2.2 Poches et motifs d'ancrage^{12;28;29;38;40-42}

L'hélice α présente sur chacune des chaînes constitue les bords latéraux de la poche peptidique et les feuillets β des deux chaînes en constituent le plancher. On compte en tout neuf points d'ancrage pour le peptide dans la niche peptidique appelés P1 à P9. Dans le cas des molécules de classe II, cinq poches d'ancrage principales ont été identifiées (P1, P4, P6, P7 et P9). Ces poches agissent à divers niveaux sur la liaison peptidique à la molécule de CMH.

La poche P1 est la plus importante car elle détermine si un peptide se fixe ou non à la niche peptidique. Elle est donc une poche d'ancrage obligatoire. Le polymorphisme de cette poche chez les molécules HLA-DR provient d'un changement d'acide aminé en position 86 (glycine/valine).⁴³ Par exemple, les molécules HLA-DR0101 possèdent une glycine en position 86, la poche ainsi créée est plus large que celle des molécules HLA-DR1501 qui possèdent une valine à cette même position. Par conséquent, les molécules HLA-DR0101 peuvent lier des résidus aromatiques et/ou hydrophobes tel que la tyrosine₃₀₈ du peptide HA (Figure 3). Les molécules HLA-DR1501, possédant une poche réduite due à la présence de la valine, permettront la fixation de chaînes aliphatiques et ne permettront pas la fixation de gros résidus aromatiques. Dans le cas du peptide HA, la molécule HLA-DR1501 fixe la valine₃₀₉ du peptide au lieu du résidu aromatique tyrosine₃₀₈.

La poche P4, seconde en importance, est considérée comme étant un résidu d'ancrage auxiliaire. La molécule HLA-DR0101 possède une arginine en P4 et, comme cet acide aminé est chargé positivement, la liaison de résidus chargés négativement ou aliphatiques est favorisée. Bien que cette poche influence l'affinité du peptide pour le CMH, son influence est toutefois inférieure à celle de la poche P1.

Finalement, les poches P6 et P9 forment un troisième type de résidu d'ancrage basé sur des contraintes stériques de la poche d'ancrage. Ces deux dernières poches jouent un rôle secondaire dans la fixation peptidique mais ont une influence sur l'affinité de la liaison peptide-CMH. La molécule HLA-DR0101 possède une proline et une leucine en P6, elle a donc une affinité pour des petits résidus aliphatiques tels que la glycine ou l'alanine. La présence de grosses chaînes latérales influencera négativement la fixation du peptide au CMH. La poche P9 de la molécule HLA-DR0101 est constituée de tryptophane et d'acide aspartique. Par conséquent, des résidus hydrophobes se fixent plus facilement. De façon générale, la poche P9 peut permettre la liaison d'une vaste gamme de résidus.

2.3 Taille et spécificité du peptide

Bien que les molécules de CMH de classe II comportent neuf poches d'ancrage, les peptides naturels élués à la surface des CPA sont d'une longueur variant de 12 à 25 acides aminés. Contrairement au CMH de classe I, les molécules de classe II sont ouvertes aux extrémités, ce qui permet la fixation de peptides dépassant les neuf poches d'ancrage. Cependant, les résidus situés à l'extérieur des neuf poches d'ancrage, jouent un rôle important en influençant divers facteurs dont:

- L'affinité du CMH pour le peptide (grâce à la formation de ponts hydrogènes)⁴⁴
- La reconnaissance par le TCR⁴⁵
- La protection contre la protéolyse⁴⁶

La présence de prolines a souvent été observée dans les régions situées à l'extérieur des poches P1-P9. Son rôle serait de bloquer la dégradation du peptide. La proline est reconnue pour bloquer l'activité enzymatique des exopeptidases.

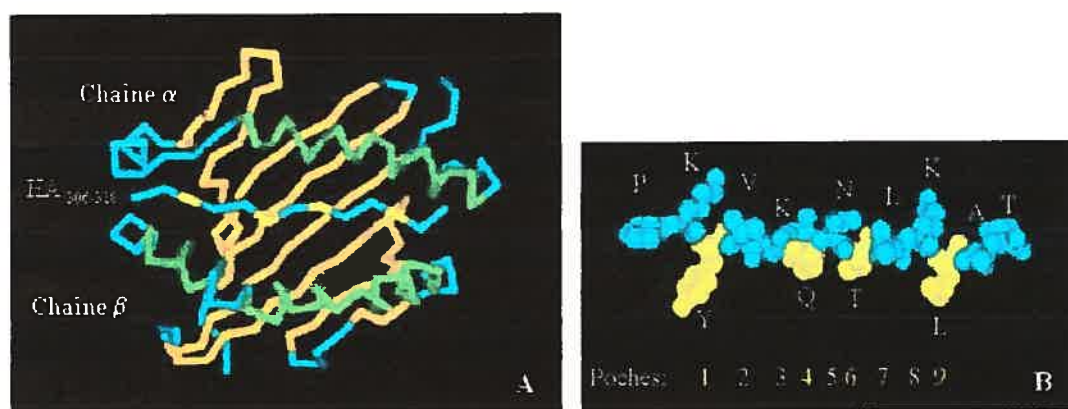


Figure 4: Sites de liaison du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ à la molécule HLA-DR1. Vue de dessus, on retrouve en **A** les hélices α du CMH représentées en vert, les feuillets β en orange et les résidus d'ancrage peptidique en jaune. Vue de côté, on retrouve en **B**, le peptide HA lorsqu'il est présent dans la niche peptidique de la molécule HLA-DR1. Les résidus d'ancrage

peptidiques sont représentés en jaune et les résidus interagissant davantage avec le TCR sont indiqués en bleu. Notez que les chaînes latérales des résidus d'ancrage sont dirigées vers le CMH et qu'elles correspondent aux positions des poches P1, P4, P6 et P9.¹³

3. Liaison CMH de classe II et lymphocytes T CD4+

La liaison des complexes peptide-CMH au TCR amorce l'activation des lymphocytes T. Plusieurs autres molécules interviennent dans ce processus dont les molécules de co-stimulation comme le CD28 ou encore des protéines d'adhésion permettant une interaction suffisante au développement d'une activation cellulaire complète. Une pleine activation résulte à la fois dans la formation d'une synapse immunologique et dans l'activation de cascades de signalisation menant à la production de cytokines et/ou à la prolifération cellulaire.

Quelques modèles ont été proposés pour expliquer les phénomènes observés lors d'une activation lymphocytaire. Tous les modèles sont cependant en accord sur certains points dont:

- L'interaction entre les TCR et le complexe peptide-CMH est de faible affinité ($K_d \approx 10^{-7}$ à $10^{-4}M$).⁴⁷
- Un nombre relativement faible de TCR (entre 10 et 100 complexes de TCR/peptide-CMH) est nécessaire à l'amorce de l'activation lymphocytaire.^{48;49}
- Il y a une corrélation entre l'oligomérisation des TCR et des CMH et l'efficacité de leur interaction pour amener une pleine activation des lymphocytes.^{50;51}

Un autre facteur influençant le niveau d'activation lymphocytaire réside dans l'affinité du TCR pour le complexe peptide-CMH. En effet, certains peptides dits agonistes ont une durée d'interaction ($t_{1/2}$ ou demie-vie) plus longue avec le TCR que des peptides dits antagonistes. Selon le "Kinetic

model", cette durée d'interaction plus grande permet une pleine activation des cascades de signalisation, permettant de générer un signal complet d'activation. Quels que soient les sous modèles, tous en arrivent plus ou moins à la même conclusion. Dans le sous modèle "kinetic discrimination model",⁵² un complexe peptide-CMH interagissant suffisamment longtemps produira un signal positif alors qu'un complexe qui n'interagit pas assez longtemps produira un signal négatif. Donc, l'activation des lymphocytes résulte dans le ratio de signaux positifs et négatifs. Dans le "kinetic proofreading model"⁵³ les signaux générés par le TCR se dégradent au cours de la cascade enzymatique. Ainsi, seuls les complexes peptide-CMH ayant une interaction suffisamment longue pourront générer des signaux suffisant pour amener l'activation cellulaire. Enfin, le dernier modèle de cette série, soit le "optimal dwell time/serial triggering model",⁵⁴ démontre l'importance de la demi-vie d'interaction TCR-peptide-CMH pour l'activation cellulaire. Cependant, ce modèle n'explique pas pourquoi des peptides dégénérés ayant une demi-vie similaire au peptide original peuvent provoquer des réponses lymphocytaires totalement différentes.⁵⁵

Finalement, le modèle du "receptor clustering/multimérisation model" propose l'oligomérisation des complexes TCR-peptide-CMH.⁵⁶ Un sous modèle, soit le "raft association model"^{57;58} suggère que les TCR sont concentrés au niveau de microdomaines membranaires.

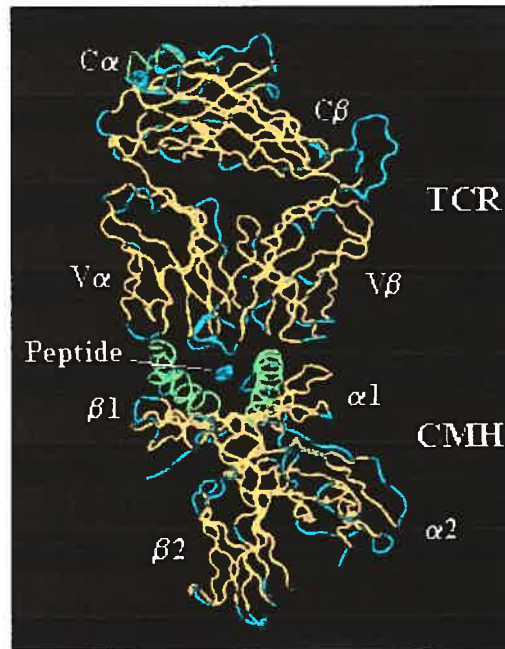


Figure 5: Sites de liaison entre le TCR et le complexe peptide-CMH. On retrouve les feuillet β en orange et les hélices α en vert. Notez que les sites d'interaction entre le TCR et la molécule de CMH correspondent aux régions variables $V\alpha$ et $V\beta$ du TCR et aux domaines variables $\alpha 1$ et $\beta 1$ du CMH. D'après Wiley *et al.*¹³

3.1 Synapse immunologique^{59;60}

L'endroit où a lieu l'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH menant à l'activation des lymphocytes T est appelé synapse immunologique. Celle-ci se forme en différentes étapes, en commençant par des changements morphologiques observés lors de la polymérisation de l'actine cellulaire. Ce phénomène a lieu au niveau des organes lymphoïdes secondaires et il est provoqué par la présence de chémokines. Ceci induit une redistribution des protéines de surface en excluant certaines des molécules de la synapse immunologique telles que CD45 ou CD43. En effet, leur taille de 50nm inhiberait toute interaction entre les TCR-CMH dont les distances sont de 14nm. Évidemment, la faible association TCR-CMH

nécessite la présence de plusieurs molécules d'adhésion dont les intégrines LFA-1 et ICAM-1 ou des molécules de la famille des immunoglobulines CD48 et CD2. Retrouvées sous forme d'une couronne appelée cSMAC (central supramolecular activation clusters), les molécules d'adhésions LFA-1 et leur ligand ICAM-1, d'une dimension de 40nm, initient le phénomène d'adhésion cellulaire. Les deux autres molécules, soit CD2 son ligand CD48, d'une dimension similaire au CMH-TCR de 14nm, assurent un lien étroit entre les complexes TCR-peptide-CMH. Leur association étroite avec le TCR-CMH serait favorisée par leur présence dans les lipides "rafts".

Ces interactions, entre les molécules d'adhésion, dure environ de 10 à 30 secondes et durant les 10 minutes qui suivent, un réarrangement des molécules ICAM-1 et CD2 a lieu. Ces dernières sont relocalisées au niveau du pSMAC (peripheric supramolecular activation clusters). De plus, les molécules de CMH de classe II accumulées à la périphérie migrent au centre de la synapse. Il y a alors stabilisation de la synapse et l'engagement du TCR avec le complexe peptide-CMH est suivi d'une cascade de signalisation induite par le complexe TCR-CD3. Même si les signaux d'activation seraient optimaux après la formation de la synapse immunologique, il a été démontré que la cascade d'activation induite par le TCR avait lieu avant la formation de la synapse.⁶¹ Le tout peut durer des heures et le recrutement de microdomaines riches en glycoprotéines se poursuit et assure le maintien de la synapse. De plus, il faut ajouter que l'on retrouve dans ces microdomaines des molécules de co-stimulation telles que CD28, les co-récepteurs CD4 ainsi que des molécules impliquées dans la cascade de signalisation comme les molécules Ick. Le tout se termine de 24 à 48 heures plus tard.

3.2 Le co-récepteur CD4⁶²⁻⁶⁴

Cette glycoprotéine d'environ 55 kDa interagit avec les molécules de CMH de classe II au niveau d'une région conservée du domaine $\beta 2$ de la chaîne β . Le domaine intracellulaire de la molécule CD4 possède un motif cystéine permettant une association avec la protéine tyrosine kinase p56^{lck}. Cette dernière joue un rôle critique dans la cascade de signalisation lors de l'engagement du TCR. D'abord considérée comme une molécule qui stabilisait les complexes TCR-CMH, la molécule de CD4 semble maintenant avoir un rôle plus important dans la signalisation cellulaire. En effet, plusieurs études ont démontré que les molécules de CD4 ne jouent pas de rôle majeur dans la liaison TCR-CMH. Une liaison stable entre le TCR et le peptide-CMH, donc dans le cas d'un peptide agoniste, assurerait un recrutement des protéines CD4 qui, par la suite, conduirait à une activation totale des lymphocytes T CD4⁺.

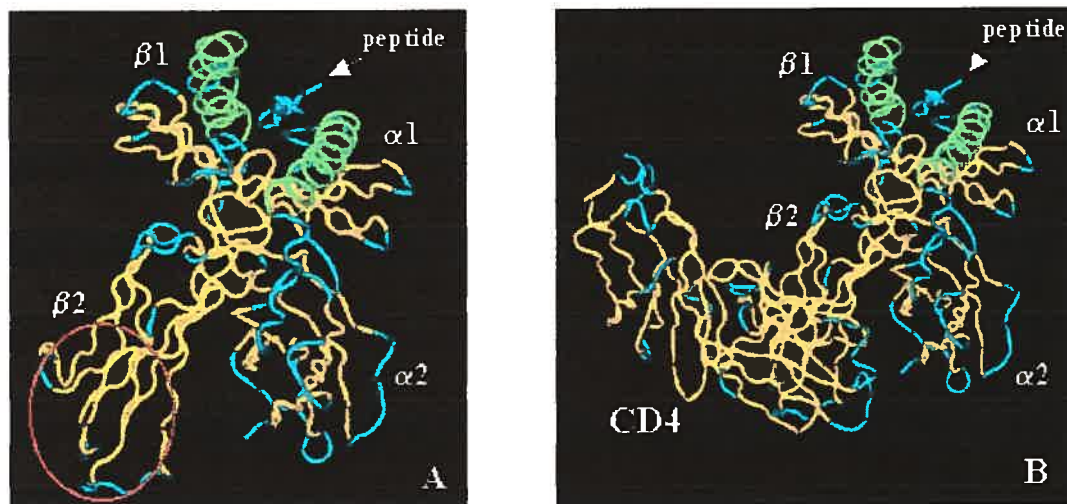


Figure 6. Sites de liaison de la molécule CD4 à la molécule de CMH de classe II. On retrouve en **A** la molécule de CMH de classe II seule chargée d'un peptide dans la niche peptidique et en **B** la molécule de CD4 humaine associée au domaine $\beta 2$ du CMH de classe II.⁶⁵

4. Méthodes d'étude qualitatives de la réponse lymphocytaire.

Jusqu'à récemment, les techniques de dilution limite et de relargage de chrome⁵¹ étaient les deux méthodes les plus employées pour étudier la fonctionnalité des lymphocytes T. Même si la technique de dilution limite permet une quantification des précurseurs cellulaires impliqués dans la réponse cellulaire, elle est dépendante de la prolifération des lymphocytes T, de leur fonctionnalité et de leur survie suite à une stimulation *in vitro*. Cette technique, bien que fonctionnelle, est laborieuse et sous estime le nombre réel de lymphocytes T.

De nouvelles méthodes, plus sensibles et ne dépendant pas de prolifération lymphocytaire, ont été développées. Il s'agit, entre autre, de l'Elispot (enzyme linked immunospot) et du marquage intracellulaire de cytokines. Dans les deux cas, la fonctionnalité des lymphocytes T est évaluée par la capacité des lymphocytes à produire des cytokines suite à une stimulation antigénique. Malheureusement, que ce soit avec la technique de l'Elispot ou de marquage de cytokines intracellulaires, il est impossible de maintenir les cellules en vie pour effectuer des analyses subséquentes.

4.1 Production de cytokines

Il existe plusieurs méthodes de détection des cytokines, certaines permettent de quantifier les cytokines relâchées dans le milieu extracellulaire comme les techniques d'Elisa (enzyme linked immunosorbent assay)⁶⁶ ou de CBA (Cytometric bead array).⁶⁷⁻⁶⁹ Toutefois, ces techniques ne donnent aucune information sur le nombre de cellules productrices de cytokines. Les techniques d'Elispot et de marquage intracellulaire de cytokines, quant à elles, permettent à la fois d'identifier la présence de cytokines et de quantifier le nombre de cellules productrices. Par conséquent, ces deux

techniques sont très utilisées pour le criblage d'épitopes pouvant servir à l'élaboration de vaccins.

4.1.1 Elispot

La technique de l'Elispot, une variante de l'Elisa, consiste à mesurer quantitativement les lymphocytes producteurs de cytokines après stimulation. Pour ce faire, on utilise des puits recouverts d'anticorps dirigés contre une cytokine d'intérêt. Différents types d'anticorps sont utilisés à cette fin dont: IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF...^{66;70-72} Par la suite, on incube à l'intérieur des puits les lymphocytes T, les cellules présentatrices d'antigènes et l'antigène pour une période pouvant aller de 6 à 24 heures. Les cytokines produites et sécrétées par les cellules T seront captées par les anticorps qui recouvrent les puits. Après avoir lavé le tout, on détecte les cytokines fixées au premier anticorps à l'aide d'un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase ou une phosphatase. Le résultat consiste en de multiples points, chaque point correspondant à une cellule sécrétrice de la cytokine d'intérêt. Cette technique, d'une grande sensibilité, est souvent employée pour le criblage d'épitope pour l'élaboration de vaccins.⁷³ De plus, selon le temps de stimulation avec les peptides, il est possible de cibler préférentiellement le répertoire des lymphocytes T effecteurs ou mémoires en plus d'avoir une appréciation quantitative du taux de cytokines produites.⁷⁴ Évidemment, le pourcentage de cellules positives sera grandement influencé par le choix des cytokines analysées.

4.1.2 Marquage de cytokines intracellulaires^{75;76}

Le marquage de cytokines intracellulaires, tout comme sont nom l'indique, permet la détection de cytokines avant qu'elles n'aient été relâchées dans le milieu extracellulaire. Il est ainsi possible de quantifier

précisément le nombre de cellules productrices de cytokines. La stimulation est la même que pour l'Elispot, cependant, les lymphocytes T sont préalablement traités avec un agent qui bloque la sécrétion des protéines (ex: Brefeldine A).⁷⁷ Les cytokines nouvellement synthétisées suite à la stimulation sont donc accumulées dans le cytoplasme et, après fixation de la cellule et perméabilisation de la membrane, elles sont révélées à l'aide d'anticorps directement conjugués à un fluorochrome. L'analyse est effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux. Selon le type de cytomètre en flux utilisé, il est possible d'effectuer et d'analyser plusieurs paramètres. En effet, plusieurs études ont combiné à la fois l'utilisation du marquage de cytokines intracellulaires, de marqueurs de surface et de multimères de CMH pour permettre d'effectuer une analyse fonctionnelle et phénotypique de populations cellulaires très rares.^{78;79}

4.2 Prolifération cellulaire

Comme certains lymphocytes T vont proliférer suite à une stimulation, il est essentiel de pouvoir suivre ces lymphocytes T précurseurs pour être en mesure d'évaluer la réponse immunitaire face à un antigène donné. La prolifération en présence de thymidine radioactive était, jusqu'à récemment, la méthode de référence pour mesurer la prolifération cellulaire. Cette méthode, très efficace, est cependant de moins en moins utilisée depuis le développement de méthodes n'utilisant pas de radioactivité. La coloration des cellules par le carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE),⁸⁰ un colorant qui lie les groupes amino des protéines intracellulaires, est de plus en plus employée pour remplacer la méthode de thymidine tritiée. Le CFSE incorporé par les précurseurs lymphocytaires sera dilué de moitié à chaque division cellulaire, permettant ainsi de connaître le nombre de cycles effectuée depuis la stimulation.⁸¹ Un autre colorant, le PKH26, peut également être utilisé à cette fin.⁸² Il s'agit d'une longue chaîne aliphatique qui rend le composé soluble dans les lipides. Tel que pour le CFSE, son

intensité est réduite de moitié à chaque division cellulaire. Ces méthodes de détection de la prolifération cellulaire ont l'avantage de pouvoir être combinées à d'autres techniques telles que les tétramères de CMH et elles permettent donc d'analyser des lymphocytes T proliférant de façon spécifique à un épitope donné.⁸³ Par contre, les cellules anergiques ou ayant atteint un haut stade de différenciation ne pourront être détectées par cette méthode.^{84;85}

5. Méthodes d'étude quantitatives de la réponse immunitaire

L'étude phénotypique des lymphocytes T impliqués dans la réponse immunitaire s'est développée grandement avec l'apparition de nouveaux outils permettant la reconnaissance des TCR spécifiques de cette réponse. Le problème retrouvé lors de la détection de TCR spécifiques est que la liaison entre le TCR et le complexe peptide-CMH est très faible. Par conséquent, l'utilisation de monomères de complexe peptide-CMH ne permet pas de lier de façon stable les TCR. Il est donc impossible d'effectuer une analyse des lymphocytes T en cytométrie de flux. Le développement d'outils possédant une plus grande affinité tels que les multimères de CMH ont permis d'augmenter de façon significative l'avidité des CMH pour le TCR. Parmi les différentes formes multimériques de CMH, ce sont les dimères et les tétramères de CMH qui sont les plus utilisés. Les multimères de CMH se sont avérés très efficaces pour la détection de populations cellulaires rares. En plus de permettre la visualisation des lymphocytes T en cytométrie de flux, l'utilisation des multimères de CMH permet la détection de tous les lymphocytes T qu'ils soient naïfs, effecteurs, mémoires ou anergiques.

Les premiers multimères de CMH ont été fait par Altman *et al* en 1996, il s'agit de molécules de CMH de classe I produites en bactérie. Par cette méthode, il a été démontré qu'il est possible de marquer des lymphocytes T *ex vivo* spécifiques à un épitope. Greten *et al* en 1998⁸⁶ ont

été les premiers à identifier des lymphocytes T cytotoxiques par l'utilisation de dimères de CMH de classe I. Pour ce faire, les molécules de CMH de classe I ont été fusionnées à des molécules d'immunoglobulines de type IgG. Cette méthode de production de multimères de CMH a l'avantage d'être faite en cellules eucaryotes et les molécules ainsi produites n'ont pas à être remises dans leur état natif comme dans le cas des protéines produites en bactérie. Par la suite, d'autres systèmes de production de CMH ont été utilisés dont la technique du "phage display"⁸⁷, les liposomes avec des CMH ancrés en surface⁸⁸, des billes recouvertes de CMH⁸⁹ et l'expression de CMH en surface de levures⁹⁰

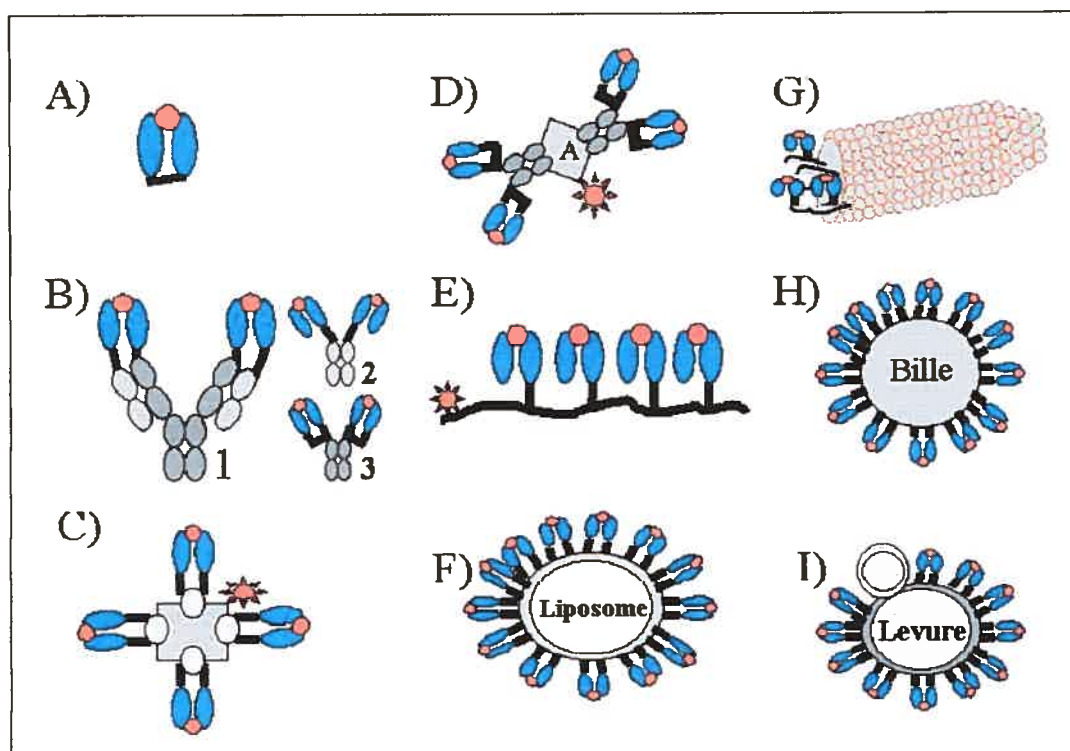


Figure 7. Représentation schématique des différentes formes de molécules multimériques de CMH. A) Monomère de CMH; B) Molécules dimériques de CMH 1- fusion IgG-CMH, 2- fusion des CMH avec les chaînes légères d'immunoglobuline, 3- fusion des CMH avec les chaînes lourdes d'immunoglobuline dont la liaison est renforcée avec un leucine zipper; C) Molécule tétramérique de CMH couplée à un fluorochrome; D) Dimère de dimère constitué de deux dimères Ig-CMH couplés à la protéine A; E) Dimère de dimère constitué de deux dimères Ig-CMH couplés à la protéine A; F) Liposome avec des CMH ancrés en surface; G) Bille recouverte de CMH; H) Bille recouverte de CMH; I) Levure avec des CMH exprimés en surface.

Multimère de CMH constitué de 2, 3 ou 4 molécules de CMH fixées de façon covalente à une séquence d'acide aminés; F-l) Outil présentant des CMH de haute densité. F) Liposome avec des molécules de CHM ancrées en surface; G) Phage filamenteux exprimant des molécules de CMH en fusion avec la protéine gp3. H) Bille avec des molécules de CMH fixées à la surface; I) Levure exprimant des molécules de CMH en fusion avec la protéine Aga2p. (adapté de ⁹¹)

5.1 Monomères de CMH

La faible avidité entre le TCR et le complexe peptide-CMH rend les liaisons instables et, de ce fait, très peu de groupes ont réussi à utiliser des monomères de CMH lors d'études portant sur des lymphocytes T. Burrows *et al.* en 1998 ont produit des molécules de CMH de classe II tronquées constituées des domaines $\beta 1$ et $\alpha 1$ des molécules de CMH. Ils ont ainsi démontré, dans un modèle d'encéphalite auto-immune de rat, que les monomères de CMH ont la capacité de lier le TCR *in vivo* et d'induire une inhibition de l'activité des lymphocytes T impliqués dans la maladie.⁹² Ce même groupe a d'ailleurs amélioré la stabilité des molécules en liant de façon covalente le peptide antigénique au CMH de classe II.⁹³ Ils ont également démontré que les molécules HLA-DR2 humaines tronquées pouvaient être produites de la même façon.⁹⁴ Dans le cas des lymphocytes T CD8⁺, il a été démontré, que les monomères de CMH pouvaient, de façon indirecte, provoquer l'activation lymphocytaire.⁹⁵ Cependant, l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺, est grandement favorisée lorsque l'avidité des complexes de CMH est augmentée. Dans les deux cas, on observe un accroissement de l'activation cellulaire en passant de dimères aux trimères et finalement aux tétramères.^{51;96;97} Bien qu'il soit possible d'utiliser les monomères de CMH pour interagir avec les TCR, la faible liaison unissant ces molécules rend très difficile toute utilisation de monomères de CMH pour identifier les lymphocytes T en cytométrie de flux.

5.2 Les dimères de CMH

La première utilisation de multimères de CMH remonte au développement des dimères de classe I. La première utilisation des dimères de CMH de classe I a été réalisée par Dal Porto *et al.* en 1993. Les dimères de CMH ont été fabriqués par la fusion des domaines extracellulaires de molécule de CMH murin (H-2Kb) et la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgG). Ces molécules chimériques de CMH-IgG solubles ont permis l'inhibition de l'activité lytique des lymphocytes T CD8⁺.⁹⁸ L'avantage de ce type de système utilisant la fusion CMH-Ig consiste en l'utilisation de cellules eucaryotes pour la production des dimères de CMH. De cette façon, les molécules produites subissent des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation et la formation de ponts disulfures et n'ont donc pas à subir un repliement *in vitro*. Par contre, il est nécessaire d'incuber la chaîne α et β 2-microglobuline en présence de peptide afin de produire une molécule complète. Abastado *et al.* en 1995, régla en partie le problème en fabriquant une molécule unique de CMH de classe I en fusionnant la chaîne α et la β 2-microglobuline.⁹⁹ Bien que l'activation de lymphocytes T CD8⁺ a été démontrée *in vitro*, aucun marquage de lymphocytes T n'a été réalisé.¹⁰⁰ Greten *et al.* en 1998 ont fait les premiers marquages lymphocytaires chez l'homme en utilisant encore une fois une fusion CMH de classe I (HLA-A2) et d'immunoglobuline de type IgG1.⁸⁶

Les dimères de classe II ont également fait leur apparition peu de temps après ceux de classe I. Hamad *et al.* en 1998 ont décrit un système de production de dimères de classe II en fusionnant la chaîne α en N-terminal de la chaîne légère d'immunoglobuline et la chaîne β en N-terminal de la chaîne lourde.⁶² Par la suite, plusieurs groupes ont raffiné le système pour améliorer l'interaction de chaîne α et β du CMH en ajoutant un leucine zipper (fos-jun).^{101;102} Finalement, les molécules chimériques de CMH-Ig se sont avérées un très bon outil permettant une analyse lymphocytaire en cytométrie de flux.¹⁰³

5.3 Les Tétramères de CMH

Les premières molécules tétramériques de CMH ont été réalisées avec un système d'expression en bactérie par Altman *et al* en 1996¹⁰⁴. Les protéines ainsi produites n'ont pas subi les modifications post-traductionnelles retrouvées dans le golgi et le réticulum endoplasmique telles la glycosylation et la formation de ponts disulfures. Le bon repliement des protéines est normalement assuré par des protéines chaperonnes qui constituent un système de contrôle de la qualité. Produites sous forme de corps d'inclusion dans la bactérie *E. Coli*, les protéines de la chaîne α et de la β -2 microglobuline sont solubilisées dans l'urée. Le repliement des protéines est effectué *in vitro* dans un milieu oxydo-réducteur permettant la formation de ponts disulfures et l'association de la chaîne α et de la β -2 microglobuline. L'absence de protéines chaperonnes rend cette étape limitante dans la production de grande quantité de molécules. De plus, le peptide utilisé lors du repliement *in vitro* influence l'efficacité et le rendement de la production. Pour multimériser les monomères, une séquence de biotinylation composé de 13 acides aminés a été ajouté sur la partie carboxy terminal de la chaîne α de la molécule de classe I. Cette séquence est reconnue par une enzyme, la BirA, qui ajoute une biotine sur la chaîne α .^{105;106} Une fois biotinylés, les CMH de classe I sont tétramérisés avec une molécule de streptavidine couplée à un fluorochrome. De façon générale, on considère que les quatre sites de liaison de la streptavidine (ou une variante) ont fixé un CMH de classe I et on parle donc de tétramère de CMH de classe I.¹⁰⁴ Plusieurs allèles du CMH de classe I ont été développés, et ce, pour différentes espèces animales dont la souris, le singe, et l'homme.¹⁰⁷

La synthèse des molécules de classe II a été plus difficile et leur utilisation est encore problématique. En effet, les molécules de CMH de classe II produites en bactérie sont très difficiles à remettre dans une bonne conformation. Seulement quelques allèles de classe II ont été produits avec succès en bactérie. La méthode de production des tétramères de classe II

est similaire au classe I. Les difficultés de production des CMH de classe II ont amené certains groupes à développer diverses stratégies pour stabiliser les molécules. Comme la présence de peptide dans la niche peptidique stabilise les molécules de CMH, on a donc fusionné la séquence peptidique à celle de la chaîne β du CMH. De cette façon, le peptide est relié en permanence à la chaîne β par un linker composé d'une séquence d'acide aminés riche en glycine (G_4S)₃. Quelques groupes ont réussi à identifier des lymphocytes T CD4⁺ grâce à ce type de construction.^{108,109}

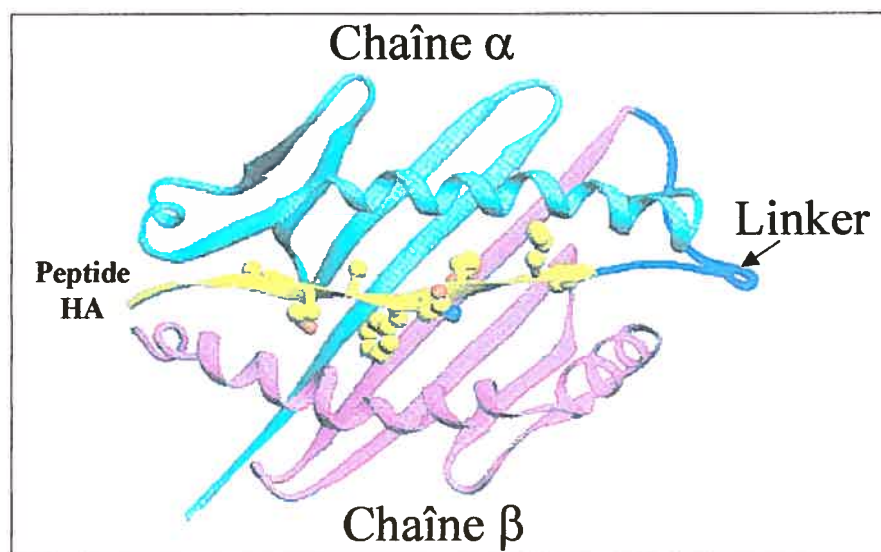


Figure 8. Molécule HLA-DR0101 liant de façon covalente le peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ par un linker flexible de 15 acides aminés. Adapté de Frémont *et al.*¹¹⁰

Une autre méthode utilisée pour stabiliser les molécules de classe II est l'utilisation de différentes séquences peptidiques stabilisatrices. Par exemple, l'utilisation de leucine zipper en carboxy terminal de chaque chaîne. Généralement, la chaîne α comporte la partie basique et la chaîne β comporte la partie acide du leucine zipper. De plus, il y a une séquence de biotinylation ajoutée en toute fin du leucine zipper. Le système utilisé pour produire ce type de tétramères est eucaryote. En effet, les cellules de la

drosophile sont utilisées à cette fin. Tant les molécules HLA-DR que HLA-DQ ont été produites.^{108;111} Une longue liste d'allèles est maintenant fabriquée dont: HLA-DR0101, HLA-DR0401, HLA-DR0402, HLA-DR0404, HLA-DR1104, HLA-DR1504, HLA-DQ1501, DQ0302 et DQ0602.¹¹²

Les difficultés rencontrées lors de la fabrication des tétramères de classe II ne sont pas les seules raisons qui rendent difficile l'utilisation des multimères de classe II. En effet, plusieurs études ont souligné la problématique de la faible expansion clonale des lymphocytes T CD4⁺ lors de la réponse immunitaire rendant leur détection difficile sans amplification *in vitro*.¹¹¹ De plus, il a été rapporté que le stade d'activation cellulaire influence l'efficacité du marquage par les tétramères.^{113;114} Finalement, le marquage est également influencé par l'affinité du TCR des lymphocytes T CD4⁺.¹⁰⁸

5.4 Multimères de CMH

L'importance de la multimérisation des molécules de CMH pour l'activation des lymphocytes T a été très bien démontrée tant pour les CMH de classe I que de classe II.^{50;51} Cochrane *et al.* ont développé un système qui permet de fixer deux, trois ou quatre molécules HLA-DR1. Il s'agit de molécules de CMH modifiées par l'ajout d'une cystéine en carboxy terminal. Celle-ci est par la suite liée de façon covalente à une molécule marquée à la fluorescéine composée de deux ou plusieurs groupes réactifs liant la cystéine. Ils ont ainsi produit et purifié par FPLC des monomères, des dimères, des trimères et des tétramères. En mesurant l'expression des marqueurs d'activation CD69 et du récepteur de l'IL2 CD25, ils ont observé une activation croissante des lymphocytes T en passant des dimères aux trimères et finalement aux tétramères.⁹⁶

5.4.1 Multimères divers

Malherbe *et al.* ont utilisé la protéine A de la bactérie *S. aureus* couplée à la fluorescéine pour conjuguer deux dimères de CMH (CMH-FC). La protéine A possède deux récepteurs FC et la liaison des deux récepteurs aux dimères de CMH forme des tétramères (dimères de dimères) possédant une plus grande affinité pour le TCR que les dimères seuls. Cependant, cette méthode est limitante quant au nombre de CMH par complexe. Le système offre tout de même une sensibilité accrue par rapport aux dimères seuls et permet donc la détection de lymphocytes T de faible affinité.¹⁰¹ Dans le même ordre d'idée, différents groupes ont réussi à construire des multimères de CMH en les combinant à des billes. De cette façon, ils ont démontré qu'il était possible d'activer de façon spécifique des lymphocytes T naïfs ou non.^{89;100} Ils ont également démontré qu'il est possible d'utiliser ce système pour marquer des lymphocytes T CD8⁺ de faible affinité ou de faible fréquence à l'intérieur d'une population mixte de lymphocytes T.^{115;116} Bien que les billes recouvertes de CMH constituent une forme multimérique de CMH, cet outil, tout comme les liposomes, les bactériophages et les levures peut être subdivisé dans une catégorie de molécules de haute densité de CMH par rapport aux dimères ou aux tétramères de CMH.

5.4.2 Liposomes

Albini *et al.* en 2000 ont développé des liposomes servant de système artificiel de cellules présentatrices d'antigènes. Il s'agit de molécules de CMH de classe II murin ancrées à la surface de liposomes. La particularité de ce système est qu'il permet aux molécules de CMH de bouger librement dans la membrane du liposome. Il est ainsi possible d'imiter de façon artificielle la formation de la synapse immunologique et d'utiliser le système pour des études sur les mécanismes d'activation lymphocytaire.⁸⁸ D'autres groupes ont également développé des liposomes-CMH servant de CPA

artificielles. Ils ont démontré que les liposomes présentant des classes II en surface pouvaient activer des lignées cellulaires¹¹⁷ ou induire l'anergie¹¹⁸. La détection de lymphocytes T CD4⁺ de faible affinité et la formation de synapse immunologique a également été démontré par le groupe de Teyton.¹¹⁹ Ce système fonctionne très bien, tant pour la détection de lymphocytes T de faible affinité que dans l'activation de ceux-ci. Il a l'avantage de pouvoir incorporer plusieurs molécules de CMH et de pouvoir combiner des molécules co-stimulatrices, par exemple. La possibilité pour les molécules de se mouvoir dans la membrane des liposomes rend cette technologie très intéressante notamment dans des études plus fondamentales telles que la formation de la synapse immunologique et les mécanismes physiologiques impliqués dans les premières étapes de l'activation cellulaire. Cependant, ce système comporte des inconvénients tels que la production et la purification des CMH, la fabrication des liposomes et l'intégration des CMH en surface de ceux-ci.

5.4.3 Expression de CMH en bactériophages

Le groupe de Gorochov a utilisé un phage filamenteux pour exprimer des CMH de classe I murin.¹²⁰ Il s'agit d'une fusion entre le peptide et le CMH de classe I (chaîne α et la β 2-microglobuline). L'expression des CMH a été faite en fusionnant la molécule de CMH avec la protéine gp3 du phage permettant ainsi l'expression de 1 à 5 molécules par phage. Cette étude démontre qu'il est techniquement possible d'exprimer des molécules de CMH à la surface de phages et que les CMH sont reconnus par des TCR spécifiques du complexe peptide-CMH utilisé. De plus, avec l'utilisation d'une fusion peptide-CMH et de la protéine gp3, il est possible d'exprimer une banque de peptides à partir d'ADNc pour cribler de nouveaux épitopes. La faisabilité d'un tel système a été démontrée par Kato *et al.*¹²¹ Cependant, même si plusieurs groupes ont réussi l'expression de CMH de classe I

conformationnels en surface de phages, il semble très difficile d'obtenir de fortes interactions entre les phages et les lymphocytes T.¹²²

5.4.4 Expression en surface de levure

Bien que des molécules de CMH aient déjà été produites dans la levure sous forme soluble¹²³ ce n'est que très récemment que Kranz *et al.* ont réussi à exprimer des molécules de classe I à la surface de levures.⁹⁰ Les molécules de CMH ainsi exprimées sont une fusion entre la chaîne α , la β -2-microglobuline et le peptide antigénique. Le tout est par la suite fusionné avec l' α -agglutinine, un hétérodimère exprimé naturellement à la surface de levures. Contrairement à l'expression de CMH en phages, l'expression en surface de levures semble être beaucoup plus efficace. En effet, les levures qui expriment des CMH de classe I ont été en mesure de provoquer une activation spécifique des lymphocytes T CD8⁺ mesurée par l'augmentation de l'expression du marqueur d'activation CD69. De plus, il est possible d'exprimer des molécules de CMH vides et de les charger avec un peptide exogène. Ce système pourrait servir à l'étude des interactions entre les cellules T et CPA comme dans le cas des liposomes. Très récemment, ce même groupe a réussi à exprimer des molécules de classe II en utilisant le même système d'expression.¹²⁴ Bien qu'ils ont démontré la faisabilité du "yeast display system" pour l'expression de CMH de classe II murin, aucun marquage lymphocytaire n'a pu être effectué.

Tableau II Caractéristiques des différentes méthodes utilisées pour l'identification et la caractérisation des lymphocytes T.

Technique utilisées	Elispot	Marquage de cytokines intracellulaires	Tétramères de CMH
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> -Permet l'analyse des lymphocytes T CD8 et CD4 sans tenir compte des allèles du CMH. -Technique permettant une analyse à haut débit. 	<ul style="list-style-type: none"> -Permet une analyse multiparamétrique. -Permet l'analyse des lymphocytes T CD8 et CD4 sans tenir compte des allèles du CMH. 	<ul style="list-style-type: none"> -Permet une analyse multiparamétrique. -Ne dépend pas du niveau de fonctionnalité des lymphocytes. -Permet le maintien en culture des cellules analysées.
Désavantages	<ul style="list-style-type: none"> -Impossible d'effectuer des analyses phénotypiques. -L'utilisation de logiciels et de scanner pour Elispot est requis. -Impossible de maintenir en culture les cellules. 	<ul style="list-style-type: none"> -Requiert un cytomètre de flux pour effectuer l'analyse. -Les cellules doivent être fixées rendant impossible le tri et la remise en culture des cellules. 	<ul style="list-style-type: none"> -Requiert la connaissance de l'allèle du CMH en plus de l'épitope qui en est restreint. -Demande une expertise pour la synthèse et le développement -Peu d'allèles sont disponibles -Un cytomètre de flux est requis pour effectuer l'analyse
Sensibilité	1: 50000	1: 10000	1: 10000
Applications	-Criblage d'épitope	<ul style="list-style-type: none"> -Criblage d'épitope -Caractérisation phénotypique. 	-Caractérisation phénotypique des lymphocytes T spécifiques d'un peptide.

Adapté de ¹²⁵

6. Introduction au projet et objectifs du travail

La caractérisation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes T impliqués lors d'une réponse immunitaire, ainsi que leur quantification, sont des éléments indispensables à la compréhension de cette réponse.

Le développement récent d'un nouvel outil, les tétramères de CMH, a permis de révolutionner la façon d'analyser la réponse lymphocytaire. En effet, il est possible, grâce aux tétramères, de détecter directement *ex vivo* les cellules T spécifiques d'un antigène. Contrairement aux méthodes plus conventionnelles comme l'Elispot ou le marquage de cytokines intracellulaires, les tétramères de CMH ne nécessitent aucune stimulation antigénique *in vitro* des lymphocytes T avant d'effectuer leur détection. C'est la multimérisation des molécules solubles de CMH sous forme de tétramères qui a permis à *Altman* et son groupe d'augmenter l'avidité des complexes CMH-peptide pour le TCR. Ceci a permis l'utilisation des tétramères de CMH comme sonde pour détecter des cellules T spécifiques d'un antigène. Pour ce faire, les molécules de CMH sont biotinylées afin d'être couplées à une molécule de streptavidine fluorescente permettant ainsi l'utilisation des tétramères comme réactif en cytométrie de flux. De nombreuses publications ont démontré l'efficacité et la sensibilité des tétramères pour la détection de lymphocytes T spécifiques d'un antigène.^{104;126-128;109;129} L'utilisation des tétramères a même servi à l'identification de nouveaux épitopes grâce à l'utilisation de peptides chevauchants codant pour la protéine VP16 du virus HSV-2.¹³⁰

Dans le même ordre d'idée, plusieurs groupes ont par la suite développé d'autres formes oligomériques de CMH. Étant donné l'importance de la multimérisation des CMH sur le degré d'interaction entre les CMH et les TCR, divers systèmes ont été développés afin de fabriquer des molécules présentant une très haute densité de CMH.

Les dimères de CMH ont été développés peu de temps après les tétramères,¹³¹ et il a été démontré que la formation de dimère de dimères à l'aide de la protéine A augmentait la sensibilité du système, confirmant ainsi l'importance de la multimérisation de molécules de CMH.¹⁰¹ Des billes recouvertes de CMH formant des molécules de haute densité ont aussi été utilisées pour identifier des lymphocytes T de faible affinité.¹¹⁶ Finalement, des liposomes possédant des CMH ancrés à la surface ont également été utilisés comme outil de détection pour des lymphocytes de faible affinité.¹¹⁹

Bien que tous ces multimères de CMH permettent la détection de lymphocytes T spécifiques d'un antigène, aucun de ces systèmes, à l'exception des tétramères, n'a été en mesure d'identifier des épitopes impliqués dans la réponse immunitaire. Or, l'identification d'épitope est essentielle tant pour le développement de vaccins que pour l'étude elle-même des cellules T spécifiques d'un antigène.

Malgré l'existence de systèmes permettant le criblage d'épitopes, aucun d'entre eux ne permet d'effectuer un criblage d'épitopes à grande échelle. Que ce soit avec la technique d'Elispot ou de marquage de cytokines intracellulaires, l'utilisation de peptides de synthèse est requis afin de stimuler les lymphocytes T. Par conséquent, les contraintes de coûts associés à la synthèse de peptides chevauchants et la lourdeur expérimentale limite généralement le recherche d'épitopes à quelques protéines.

Le développement d'un outil permettant le criblage d'épitopes à grande échelle serait un atout majeur en immunologie. Le groupe de Gorochov a d'ailleurs décrit un système d'expression en phage permettant l'expression de molécules de CMH de classe I. Pour ce faire, ils ont lié de façon covalente le peptide à la chaîne α du CMH de classe I en fusion avec la protéine gp3 du bactériophage.⁸⁷ La présence d'interactions spécifiques entre les phages exprimant des CMH et des TCR spécifiques a été démontrée par la stimulation de cellules T. Grâce à la construction d'une séquence d'ADN codant pour la molécules de CMH possédant un peptide lié

de façon covalente à la chaîne α du CMH, il est possible, par l'intégration d'une banque d'ADN, d'exprimer une librairie peptidique et ainsi être en mesure de cribler un très large répertoire d'épitope. La faisabilité d'un tel système a été confirmé par Kato *et al.*¹²¹ Malheureusement, l'expression de seulement quelques molécules de CMH (1-5 molécules par phage) est un facteur limitant du système d'expression en phages. Compte tenu de l'importance de la densité des CMH présents sur l'outil de détection, un système offrant un nombre accru de molécules de CMH offrirait sans doute une meilleure sensibilité dans la détection des lymphocytes T.

6.1 But et méthodologie

Étant donné l'absence d'outil permettant l'identification à large échelle d'épitopes présentés par les CMH de classe II, l'objectif de ce projet est de développer un nouvel outil pouvant servir à cette fin. Seuls les systèmes permettant d'exprimer des CMH sous forme multimérique ont été considérés afin de favoriser la détection de lymphocytes T CD4⁺ de faible affinité.

Le système d'expression en surface de levures décrit par Wittrup et ses collaborateurs a permis d'exprimer des TCR et des anticorps à la surface de la levure *S. cerevisiae*.^{132;133} Plus récemment, Kranz et son groupe ont réussi l'expression de CMH I et de classe II murin avec le même système.^{90;134} La faisabilité du système ayant été démontrée pour les molécules de CMH de souris et la capacité des levures à exprimer une grande quantité de molécules recombinante en surface (plus de 10 000), en ont fait un choix tout désigné pour l'expression de molécules de CMH de classe II humain.

Nous proposons d'utiliser le peptide modèle HA du virus de l'influenza présenté dans le contexte des molécules HLA-DR β *0101 pour démontrer l'efficacité du système d'expression en surface de levures dans la détection

de lymphocytes T spécifiques au peptide HA lorsque présenté dans les molécules HLA-DR β *0101.

Le choix du peptide HA et des molécules HLA-DR1 a été influencé par de nombreuses publications concernant à la fois les molécules HLA-DR complexées avec le peptide HA, l'utilisation de multimères de CMH de classe II dans la détection de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques au peptide HA et le TCR reconnaissant le peptide HA.^{9;40;110;113;135;136} De plus, certaines maladies auto-immunes sont associées aux molécules HLA-DR et ces molécules sont impliquées dans les problèmes d'alloréactivité rencontrés lors d'une greffe d'organe.

En conclusion, l'outil développé dans ce projet servira à la détection et la visualisation de lymphocytes T spécifiques d'un antigène en cytométrie de flux. L'utilisation d'un colorant lipophylique, le PKH26, permet d'obtenir des levures fluorescentes pouvant servir de sonde en cytométrie de flux pour visualiser les lymphocytes T spécifiques d'un antigène. De plus, pour être en mesure d'utiliser le système d'expression en levures comme outil d'identification d'épitope à haut débit, nous avons construit une molécule HLA-DR possédant un peptide lié de façon covalente à la chaîne β . Il est donc possible d'intégrer une banque d'ADNc servant de séquence codante pour le peptide et ainsi exprimer une librairie peptidique présentée par les molécules HLA-DR1 en surface de levures. La spécificité de notre système est validée par des lignées T CD4⁺ spécifiques au peptide HA utilisé.

Chapitre II

Résultats

**Development of a novel tool to identify antigen specific CD4+
T cells by MHC class II yeast surface display.**

**Luc English; Gaelle Breton; Bader Yassine Diab; Jacques Thibodeau
and Rafick-Pierre Sékaly¹.**

Département de Microbiologie et d'Immunologie, Faculté de
Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128 succursale Centre-ville,
Montréal, Québec, H3C 3J7

¹ Corresponding author e-mail: 

7.1 ABSTRACT

Recent advances in the capability to detect antigen-specific T cells have been a key factor in our understanding of cellular immune response. Major histocompatibility complex (MHC) multimer technology offers a powerful tool for direct identification of antigen-specific T cells. However, the problems of low CD4⁺ T cells frequency and TCR avidity found with MHC class II multimer technologies has almost blocked the progress of MHC class II multimer applications. Development of multimeric forms of MHC allowing higher density of MHC molecules will constitute a useful tool in the detection of low affinity CD4⁺ T cells. Here, we show that yeast cells can be used to express human MHC class II molecules to generate multimeric forms of MHC. Out of four constructs encoding for the MHC class II molecule with a covalently linked HA peptide, two constructs were expressed and detected on the surface yeast cells by flow cytometry and by microscopy using different conformation-specific anti-MHC class II antibodies (L243 and LB 3.1). In addition, the PKH26 labeled-yeasts expressing HLA-DR1 molecules loaded with HA peptide have proved to be an effective, though suboptimal, way to analyze TCR specificity by flow cytometry. The proof of concept of this approach was demonstrated using a T cell line specific for the HA peptide bound to HLA-DR1 molecules. Moreover, the interaction observed between T cells and yeast was inhibited by pre-incubating HA specific T cells either with an anti-TCR or an anti-CD4 antibody. Despite the successful visualization of antigen-specific T cells, activation of HA specific CD4⁺ T cell line could not be demonstrated. Our results indicate that the yeast display system can be used to express MHC molecule with covalently linked peptide as a direct tool for probing T-cells and for selecting TCR ligands from genetic libraries encoding randomized peptides.

Keywords: Antigen, hemagglutinin, multimer, epitope, immune, T cell receptor, influenza.

7.2 INTRODUCTION

Many powerful methods have been developed to identify T cells based on their antigen specificity however, most of these techniques, which include the Elispot assay¹ and intracellular cytokine staining,² require *in vitro* stimulation which can affect the T cell phenotype and function. During the last ten years, innovation in tools that allow the direct identification of antigen specific T cells, began to gain importance with the introduction of multivalent MHC molecules.³ Indeed, multivalent recombinant MHC molecules have been engineered and produced to analyse specific interactions between TCR and peptide-MHC complexes. Even though it has been demonstrated that monovalent MHC molecules can be used to modulate T cells activity,⁴⁻⁷ the weak interaction observed between soluble monovalent MHC and their ligands led to an unstable association of the MHC to the TCR. Thus, several groups have developed different systems to produce multivalent forms of MHC molecules in order to increase the avidity between the TCR and MHC molecules allowing the use of multivalent MHC molecule to identify and visualize antigen-specific T cells by flow cytometry.

Two major systems are currently used to produce soluble recombinant multivalent MHC molecules. The first, introduced by *Altman* and colleagues, was the production in bacteria of soluble recombinant MHC molecules bearing a biotinylation sequence. By coupling the biotin of each MHC to a fluorescent streptavidine, this group was able to produce stable multimerized MHC molecules curtailing initial difficulties found with the use of monomers.³ Multimerized MHC molecules were also obtained by fusing the MHC coding sequences to an immunoglobulin scaffold as developed by *Schneck* and colleagues.⁸ In both systems, successful interactions could be observed between the multimerized forms of MHC and the TCR. Moreover, both multimerized forms of MHC allowed visualization of antigen specific T lymphocytes, their quantification and their further characterization by multiparameter flow cytometry.⁹⁻¹⁹

Though these systems were used at first to express the MHC class I molecule, different groups have since applied the same kind of technology to MHC class II molecules.²⁰⁻²⁶ Regrettably, these tools at present are not suited for identification of new epitopes which is a growing goal of many vaccine studies. One of the most interesting systems to date described for such a purpose is the phage display technology which has been used to express MHC molecules with covalently linked peptides.²⁷ With such a system a high throughput screening of T cell epitopes can be done by integrating DNA fragments generated from cDNA libraries in the open reading frame of MHC molecules. The availability of combinatorial T cell epitope libraries made using a MHC phage display system has been investigated and supported by *Kato* and colleagues.²⁸ The phage display has shown a specific binding to immobilized recombinant TCR but unfortunately this technology was unable to visualize specific interaction between phage and T lymphocyte by flow cytometry. In addition, the phage display technology, which takes advantage of *E.coli* as expression system, does not permit posttranslational modifications that normally occur in mammalian expression systems.

The yeast display system recently developed by *Wittrup et al.* uses the α -agglutinin mating factor as fusion partner to express the protein of interest on the surface of *S. cerevisiae*.²⁹ The yeast display system offers, compared to phage display, the possibility to isolate individual yeasts expressing the protein of interest by using fluorescence-activated cell sorting (FACS).³⁰ This system has been used to express different molecules such as recombinant T cell receptor³¹⁻³⁵ or recombinant antibodies^{36;37} and in both cases it was shown that the yeast display system could be used to study *in vitro* affinity maturation.^{30;33-40}

Recently, *Kranz et al.* have demonstrated the efficiency of the yeast display system to express murine MHC class I molecules either in fusion at the N-terminus or at the C-terminus of the Aga2p subunit of α -agglutinin receptor.⁴¹ Moreover, the same group has shown the *in vitro* evolution of murine MHC class II molecules expressed on the surface of *S. cerevisiae*.⁴²

In the current study, we show that the yeast display technology can be applied to express different single chains of HLA-DR1 molecules with a covalently linked peptide. In addition, yeasts expressing peptide-MHC complexes can be labelled with a fluorescent dye and used as probe to detect antigen specific T cells by flow cytometry. The above proof of concept suggests that it is possible to use this system as a screening tool to identify antigen specific CD4⁺ T cell epitopes using a genetic library encoding randomized peptides.

7.3 Materials and Methods

7.3.1 MHC constructs

Three different vectors were used to engineer a single chain (sc) of the HA-MHC class II molecule which was used as a template for PCR cloning. The pLM1 plasmids that encode the α chain with a biotinylation sequence (BirA), the HLA-DR β 0101* chain with covalently linked HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide and the scHLA-DR β 0101* sequence linked by a 16 amino acid residue linker (G₄S)₃⁴³ to the HLA-DR α 0101* (SC11) were provided by *Cameron T.* and *Stern LJ.*²⁴ The HA- β chain vector was digested (*Bsu 361* and *Hind III*) as well as the α chain-Bir-A vector (*Xcm1* and *Hind III*) and the SC11 (*Bsu 361* and *Xcm1*). Gel purified DNA fragments were ligated to obtain a single chain of the HA peptide-HLA-DR1 (scHA-MHC) molecule with a biotinylation sequence (BirA). The scHA-MHC class II construct was amplified by PCR using a forward primer (5' CGC AGA TCT ACG CGA ATT CCT ATA GTG CAG 3') adding a *Bgl II* restriction site and by a reverse primer (5' CGC CAA TTG CTC TGT AGT CTC TGG GAG AGG 3') adding a *Mfe I* restriction site and removing the biotinylation sequence at the end of the α chain. For construct 1 (figure 9) PCR amplification products were digested with *MfeI* and *Bgl II* enzymes and the pYD1 vector was digested by *EcoRI* which gives a compatible end to the *Mfe1* enzyme and by *BamHI* which is compatible to the *Bgl II* restriction site. The ligation mixture was transformed into DH5 α *E. coli*. Construct 2 was obtained by PCR amplification of HA-MHC vector using the forward primer (5' GGG ATG GGT GGT TCT GCT AGC ATG GGG GAC ACG CGA ATT CCT 3') incorporating a *Nhe1* restriction site upstream of the β chain. The reverse primer used (5' ACC AGT CAT GCT AGC CTC TGT AGT CTC TGG GAG A 3') contained a *NheI* restriction site downstream the α chain. The PCR product and pYD1 vector were digested, ligated and transformed into DH5 α *E. coli*. A modified pYD1

vector was made by adding a restriction site between the Aga2 signal peptide and the Aga2 mature protein. The modification was done by using two overlapping PCR products. The first PCR amplification was done with a forward primer (5' TCG CTG TTT TTC AAT TTC TGT TAT TGC TTC AGT TTT AGC ACA GGA ATG CAC AAC TAT ATG CGA GCA AAT CCC CTC ACC AAC TT3') to add a *Bsm 1* restriction site into the pYD1 DNA sequence, the reverse primer used (5' GAT GGT GAT GAC CGG TAC GCG TAG AAT CGA GAC CGA GGA GAG GGT TAG 3') amplified the pYD1 vector from the *Age1* restriction site at position 1039. The second PCR reaction used a forward primer from *Age 1* restriction site located at position 71 in pYD1 vector and the reverse primer (5' AAG TTG GTG AGG GGA TTT GCT CGC ATA TAG TTG TGC ATT CCT GTG CTA AAA CTG AAG CAA TAA CAG AAA ATA TTG A 3') contained a *Bsm 1* restriction site. Both PCR amplicons were digested by *Bsm-1* enzyme and annealed. The annealing mixture and original pYD1 vector were digested by *Age 1* enzyme and ligated. After transformation, the modified pYD1 plasmid was used to express the HA-MHC class II molecule. For construct 3 (figure 9) scHa-MHC class II plasmid was used as template to introduce, by PCR, a *Bsm-1* restriction site at both ends of the scHA-MHC class II molecule. The forward primer (5' GGG CAA TGG CGA ATG CAC GCC CAA GTA TGT CAA ACA GAA 3') was used to introduce the *Bsm-1* site at the 5' end and the reverse primer (5' TCG GCC ACT CCG CCT GCA TTC CTC TGT AGT CTC TGG GAG A 3') was used to introduce the *Bsm-1* restriction site at the 3' end. The PCR product and the modified pYD1 vector were digested by *Bsm-1*, ligated and transformed in *E. coli*. Construct 4 (figure 9) was produced by amplifying construct 3 vector with the reverse primer (5' TGC TCG CAT ATA GTT GTG CAT TCA TTG GTG ATC GGA GTA TAG TTG GAG CG 3') to add the *Bsm-1* restriction site at the end of the $\alpha 1$ domain and a forward primer (5' GGA TAT CTG CAG AAT TCG CCC TTC CGG AAT TCC CTA AGG GCA GCG GAG GAA GCA TCA A 3') was used to amplify the sequence introducing a *Bsu361* restriction site and a linker (G₄S)₁ upstream

the $\alpha 1$ domain of the MHC class II molecule. The modified pYD1 vector containing construct 3 as well as the latter PCR products were digested by *Bsu 36 1* and *Bsm-1* enzymes. DNA fragments were purified from agarose gel, ligated and transformed to obtain a truncated form of MHC class II molecule.

7.3.2 Cell culture.

The Jurkat HA specific T cell line A14⁴⁴ provided by Dr O. Acuto (Institut Pasteur) was cultured at 37°C, 5% CO₂ in RPMI 1640, 10% FCS, 20 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin, 2 $\mu\text{g/ml}$ puromycin and 315U/ml of hygromycin. Non transfected Jurkat T cells, E6.1 (ATCC TIB 152) were cultured at 37°C, 5% CO₂ in RPMI 1640, 10% FCS supplemented with 20 $\mu\text{g/ml}$ of gentamicin.

7.3.3 Transformation of the yeast *S.cerevisiae* EBY100 with lithium acetate.

One colony of EBY100 was inoculated in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) and grown overnight at 30°C until OD₆₀₀ of 1.5 was reached. The culture was then diluted in YPD medium in order to bring back the OD₆₀₀ between 0.2 and 0.3. This was then incubated at 30 °C for about 3 hours until a density of OD₆₀₀ of 0.4 to 0.6 was reached. 2ml from this culture was then centrifuged at 5000g for each transformation and washed once in PBS, centrifuged and resuspended in 50 μl PBS 1X. A volume of 2 μl of salmon sperm DNA (10 mg/ml) was then added. This carrier DNA was heated for 10 minutes at 100 °C and then cooled for 5 minutes on ice. 1 μg of pYD1 vector DNA was then added and gently vortexed. Then 500 μl of plate mix (PEG 4000 45%, 0,1M lithium acetate, 0.01M Tris-HCl pH7,5 and EDTA 0,05M) was added. This mixture was then vortexed and 200 μl of 200 mM DTT was added following mixing by vortex and incubated overnight at room temperature. Heat shock was then

performed for 10 minutes at 42°C and yeasts were pipeted immediately at the bottom of an eppendorf tube (about 75% of total cells) and inoculated in tryptophane-negative medium for 48 hours at 30°C.

7.3.4 Induction of the fusion protein

One clone from the tryptophan-negative plate was selected and then inoculated into YNB-CAA medium (0.67% yeast nitrogen based 0.5% casamino acids and 2% raffinose). The culture was grown for 24 to 36 hours at 30°C with gentle mixing until $O.D_{600} > 3$. The culture was centrifuged and then resuspended in YNB-CAA galactose medium in order to bring the OD_{600} between 0.3-0.5. This mixture was grown for 48-96 hours at 20°C.

7.3.5 Antibodies used for MHC detection

The following monoclonal antibodies (mAbs) were used for FACS and microscopy analysis. Conformation dependant L243 antibody, Fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) labeled mouse IgG2a anti-HLA-DR (clone L243, BD Pharmingen); FITC or PE-labeled $F(ab')_2$ goat anti-mouse, IgG2a and IgG2b chain specific (BD Pharmingen); Anti-V5 or FITC-labeled anti-V5 monoclonal antibody used to detect a 14 amino acids tag epitope was purchased from Invitrogen; Monoclonal antibody IgG2b LB3.1,⁴⁵ a conformation dependent anti-HLA-DR and the anti-MHC class II monoclonal antibody XD5.117⁴⁶ was purified from hybridoma supernatants; Secondary antibody FITC or PE-labelled goat anti-mouse was purchased from Caltag Laboratories; Anti-TCR PAN α/β (clone BMA031) IgG2b from Beckman Coulter; FITC-labeled anti-CD4 (clone SK3); mouse IgG1 from BD Pharmingen; Rabbit polyclonal anti-HLA-DR β chain; HRP conjugated rabbit IgG was purchased from Jackson Immunoresearch Laboratories; FITC-labeled anti-MHC class I (BD Pharmingen).

7.3.5 Immunofluorescence and Flow Cytometry

10^8 yeast cells were induced as described above. Following induction, one wash was carried out in PBS 1X and the pellet was then resuspended in 250 μ l of PBS-BSA (1mg/ml). Cells were stained with 0.5 μ g of the V5 specific antibody (Invitrogen, CA) or 1 μ g of L243 or LB3.1 antibody specific for properly folded MHC class II molecules. Incubations were carried out on a rotator at 4 $^{\circ}$ C for 30 minutes. Following this incubation, cells were washed three times in PBS and resuspended in 25 μ l of PBS supplemented with 50% of glycerol. 5 μ l of this suspension was then dropped on a slide and analyzed by fluorescence microscopy. The same staining procedure as described above for immunofluorescence was used for flow cytometry. At the end of the washes, yeast cells were resuspended in 400 μ l PBS and analyzed on a FACSort (BDBiosciences San Diego,CA).

7.3.7 Western Blot

The protein complex formed by the fusion between Aga2p and MHC class II molecules can be disassociated from the yeast cell surface by cleaving disulfide bonds, which retain the Aga2 protein linked to Aga1 protein. This cleavage was performed by adding a reducing reagent. To perform this enrichment, 10^9 freshly induced yeast cells were centrifuged at 5000g for 5 minutes, and washed twice with 1X PBS. Following washes, the yeast cells were resuspended in 500 μ l 1X PBS to a final concentration of 50 mM DTT, 0.1 mM PMSF 1mg/ml leupeptin and 0,7mg/ml pepstatin. This mix was incubated for 2 hours at room temperature and subjected to constant agitation. Supernatants were collected by centrifugation at 5000g for 5 minutes. The sample was then deposited on a 12% polyacrylamide gel and migrated at 120 volts. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane (Amersham, Pharmacia Biotech). The nitrocellulose membrane was incubated in PBS-5% fat free powder milk blocking solution to avoid any

background. MHC class II molecules were detected using either monoclonal anti-V5 tag antibody or rabbit polyclonal anti- β chain of MHC class II molecules at a concentration of $1\mu\text{g}$ in the blocking buffer. After 1 hour at room temperature, the membrane was washed three times for 5 minutes in PBS 1X supplied with 0.02% tween 20. This first step was then followed by a revealing step using a secondary goat anti-mouse immunoglobulin coupled to horseradish peroxidase. The membrane was then washed three times in PBS-tween 20 and finally 5 minutes in PBS 1X and revealed by incubating 2 minutes in the presence of the horseradish peroxydase substrate, ECL (Amersham, Pharmacia Biotech), followed by autoradiography.

7.3.8 *In vitro* conjugate formation between T cells and Yeast

Before conjugate formation, the yeasts were labeled with a long-chain aliphatic dye (PKH26) as described by the manufacturer (Sigma-Aldrich Co). Approximately 1×10^8 yeasts were combined with 1×10^6 T cells in a total volume of $200\mu\text{l}$. The cells were pelleted (10 seconds at 500g) together and incubated for 15 min at 37°C . Then, cells were diluted to $400\mu\text{l}$ with formaldehyde at a final concentration of 2%. Yeast-T lymphocyte conjugates were analyzed immediately on a FACSort (1200 events/second) or by fluorescent microscopy. The inhibition assays were performed by a pre-incubation of the Jurkat cells either with an anti-TCR PAN or anti-CD4 for 30 min at 4°C . Then, the conjugate formation assay was performed as described above.

7.4 Results and discussion

7.4.1 MHC class II constructs for yeast display

To evaluate the yeast display system as a tool to express MHC class II molecules, we cloned four different MHC class II constructs into the pYD1 vector. Many studies have shown that the presence of peptides in the binding groove stabilizes the MHC complex.⁴⁷⁻⁴⁹ In all our constructs we fused the immunodominant influenza HA peptide in a manner to favor refolding of the whole molecule (figure 9). The choice of the HA peptide was influenced by the fact that many observations regarding the structure of HLA-DR molecules loaded with HA peptide have been published.⁵⁰⁻⁵² The single-chain HA-MHC class II was cloned into the yeast display vector pYD1 at the C-terminus of the AGA2 protein in both constructs 1 and 2 (figure 9). Located at the C-terminus of the signal sequence, AGA2p is the subunit of the α -agglutinin receptor that allows the display of MHC molecules by disulfide linkage to the AGA1p subunit. For the construction of the single-chain HA-MHC class II, the HA peptide was covalently linked to the β chain by a 15 amino acid residue linker^{53;54} (G₄S)₃ (Linker 1) and the α chain was covalently attached to the β 2 domain of the β chain by a 20 amino acid residue linker⁵⁵ (G₄S)₄ (Linker 2). V5 is a 14 amino acid residue epitope tag included at the C-terminus of the fusion protein. In all cloning strategies, we used the V5 epitope tag to monitor if the entire protein was coded and displayed at the surface of the yeast.

Based on V5 tag staining, 50% of yeast transformed with construct 1 were able to express the MHC molecule on the surface after 48 hours of induction. However, the MHC class II molecules were undetectable using the conformational anti-HLA-DR L243 antibody (data not shown). The same single chain of HA-MHC class II was cloned at the carboxy terminal of the AGA2 protein in Construct 2 but immediately downstream of a flexible linker made of glycine and serine. Similar expression, based on V5 tag staining,

was observed with construct 2 and still the MHC class II molecules were undetectable using the L243 conformation dependant anti-HLA-DR antibody (data not shown). One hypothesis to explain the absence of staining with a conformational antibody was the fact that the peptide fused between the AGA2 protein and the MHC class II molecule was unable to fold properly inside the binding groove. Thus, the pYD1 vector was modified to introduce a restriction site between the DNA sequence encoding the signal peptide of AGA2p and the mature AGA2 protein. In construct 3, we cloned the single-chain of HA-MHC class II at the N-terminus of the AGA2 protein. As the cleavage site was located between the signal sequence and the first amino acid of the peptide, the N-terminus of the HA peptide became free of any fusion. The N-terminus end of the peptide has been described as the most important residue for binding to the MHC molecule (pocket 1).⁵⁶⁻⁵⁸ We also tried to optimize the expression of properly folded MHC by decreasing the size of the MHC molecule in construct 4. Constant regions of $\beta 2$ and $\alpha 2$ have been removed from the DNA sequence of HLA-DR1 molecule as previously described for the expression of HLA-DR2 molecules⁵⁹ and rat MHC class II.⁶⁰⁻⁶²

7.4.2 MHC class II display analysis

Yeasts transformed with construct 3 and 4 were induced for the expression of human MHC class II molecules. Surface expression of the proteins was monitored by flow cytometry and by fluorescent microscopy in order to assess the proper folding and expression of MHC class II protein at the surface of the yeasts (Figure 10). Flow cytometric analysis was performed on both constructs, 3 and 4 using an anti-V5 antibody in order to determine if the entire reading frame was displayed at the surface of the yeast. Figure 10A shows the results obtained with construct 3 but similar results were also observed with construct 4, except that the surface expression of MHC molecule was delayed (Data not shown). As more than

60% of yeast were detected using the anti-V5 tag epitope antibody, we performed a labelling with an antibody that recognizes only the properly folded MHC (L243 antibody). A weak signal of 1 % was observed with either construct 3 or 4 using the L243 antibody and both constructs gave similar staining with the conformation dependant L243 antibody. To confirm the specificity of the signal obtained with the conformation dependant antibody, we performed a staining with the XD5.117 antibody, which recognizes both the native and the denatured forms of MHC class II, in order to validate the data obtained with the L243 antibody. As the same percentage was observed with either L243 or XD5.117 (figure 10A), we can conclude that from 60% of yeast detected by the V5 antibody for the expression of MHC molecules only 1% expressed a properly folded MHC.

Fluorescence microscopy analysis (shown in figure 10B), correlated with our Facs findings with L243 or XD5.117 antibodies. In addition, we used an other conformation dependant antibody, LB3.1, to visualize and confirm the presence of properly folded MHC at the surface of the yeast.

7.4.3 Biochemical analysis of MHC class II fusion proteins

The yeast mating factor AGA2p that allows the display of the fusion protein is linked to AGA1p subunit by two disulfide bonds. Thus, it was possible to cleave the link and remove our protein of interest from the surface of the yeast to perform biochemical analysis. In figure 10C, Western blot analysis were done with either the polyclonal anti-MHC class II β chain or the monoclonal anti-V5 antibody and both antibodies confirmed that the peptide-MHC complexes migrated to the expected molecular weight of 90kDa (red arrow). The two lower bands observed with the anti- β chain seem to be the result of a cleavage between the AGA2 protein and the MHC molecule. Indeed, the molecular weight of 35 kDa of the lowest band corresponds to the molecular weight of the AGA2 protein and the second observed band from the bottom corresponds to the molecular weight of

60kDa which is similar to the molecular weight of the recombinant HA-MHC protein used as positive control in this experiment (last column, figure 10C). The problem concerns the degradation of unstable protein expressed in fusion with AGA2p have been discussed by Shusta *et al.*³³ She has demonstrated that fusion of proteins at the 3' sequence of AGA2 may affect the stability of proteins expressed on yeast cells. The molecular weight observed with construct 4 was 60 kDa (data not shown).

Based on our results, we decided to use the construct 3 and 4, both cloned at the N-terminus of the AGA2 in the modified pYD1, to evaluate their capacity to be recognized by specific T cell receptors.

7.4.4 Specific interactions between yeast expressing HA-MHC class II and T cells

In order to assess the efficacy of the chimeric MHC class II molecules expressed at the yeast surface in interacting with a specific TCR, we performed a conjugate formation assay between Jurkat T cells and yeast-MHC class II. As yeast cells expressing recombinant protein have been used for conjugate formation assay with T cell in order to identify ligands that trigger T cell activation, we have applied the same protocol with few adaptations.⁶³ Two different Jurkat cells lines were used to determine the presence of specific interactions between the yeast expressing HA peptides in an HLA-DR β 0101*-restricted setting and the TCR molecules. The A14 cell line, derived from a Jurkat T cell mutant selected for lack of TCR expression and transfected with genes coding for the HA1.7 TCR, was used as HA-specific cell line. The E6.1 cell line, which expressed an irrelevant TCR, was used as a negative control. The conjugate assay was performed by labeling the yeast with a cell tracker reagent. PKH26, a long aliphatic dye that can be detected by flow cytometry was used to this end. A14 or E6.1 Jurkats were mixed with PKH26-labeled yeasts expressing either construct 3 or construct 4 in ratios covering 1-10 to 1-100 Jurkats per yeast. After a short

centrifugation and an incubation at 37°C, cells were gently resuspended in 2% formaldehyde in order to stabilize the conjugates. Cells were then analyzed by flow cytometry and T lymphocytes were gated based on their FSC and SSC profiles. Conjugate formation was measured as an increase in the fluorescence of the gated population. As shown in figure 11A, both constructs gave a higher signal when the A14 HA-specific cell line was used to make conjugate with yeast as compared to the irrelevant E6.1 cells. For construct 3, 52% of HA specific T cells were conjugated with yeast whereas a background level of 24% was observed using the irrelevant cell line E6.1 (n=6). Construct 4, gave almost a similar result except that the background level observed with the irrelevant T cells line E6.1 was always lower (n=6).

In addition, a fluorescent microscopy analysis was carried out to confirm the presence of physical interaction between both cell populations. Figure 11B shows a representative "rosette" observed after a conjugate formation assay between A14 cell line and yeast transformed with constructs 3 or 4. Moreover, the microscopic analysis confirmed the absence of PKH26 diffusion into the T cell during our conjugate formation assay. The problem associated to passive PKH26 diffusions have been observed only after extensive incubation at 37°C. This problem was fixed with extensive washing after yeast PKH26 labeling.

7.4.5 Inhibition of interaction by CD4 and TCR specific antibodies

To confirm that the signal observed in flow cytometry for the presence of conjugates originated from an antigen-specific interaction between yeasts and T cells, we performed inhibition assays using anti-TCR or anti-CD4 antibodies on both constructs. As shown in figure 12, inhibition of the interaction was observed in a dose dependant manner with both antibodies. This inhibition experiment has been repeated using an anti-CD4 antibody for the construct 3 and an anti-TCR for the construct 4 and similar results were observed (data not shown). The interaction was not affected by the

presence of irrelevant antibodies such as anti-MHC class I for construct 3 or FITC-conjugated IgG2a antibody for construct 4. Adding 0,5 µg of inhibitory antibodies was sufficient to decrease the formation of conjugates to background levels (similar to the level observed with the irrelevant E6.1 Jurkat cells).

The MHC class II yeast display system shows a great potential as a tool to detect antigen specific T cell. However, modifications in our system need to be done in order to get rid of unspecific interactions observed during the conjugate formation assay with the irrelevant cell line. Moreover, a variability in terms of percentage of positive cells was seen among independent experiments. From our observations of non-specific interaction seen between yeasts and irrelevant E6.1 cells we can infer that the variations mentioned above are probably caused by antigen-independent interactions between A14 cells and yeast expressing HA-MHC class II molecules. In addition, the presence of only 1% of yeast expressing a properly folded MHC, based on L243 staining, is perhaps a limitation for this kind of application. From the 1% of properly folded MHC detected with L243, maybe only a fraction is still correctly folded prior to and during the staining. A problem of stability has been described with the MHC phage display system.⁶⁴ When the phages are incubated at 37°C, more than 40% of MHC molecules can be denaturated in less than hour. As our conjugate formation assay includes an incubation at 37°C, this can perhaps affect the stability of the MHC class II expressed on the yeast surface. It has been described in previous studies that some recombinant proteins, such as T cell receptor (TCR) could not be expressed properly on the yeast surface without mutations.^{33;65;66} Thus, the random mutated approach described by *Wittrup et al*, is probably the best way to improve the sensitivity and the affinity of the MHC molecules for their ligands. This technique called "directed evolution" consists of creating large DNA libraries coding for randomly mutated proteins. Following the expression and the display of these proteins on yeast, favorable mutants are selected from the pool by flow cytometry. This

kind of approach has been described by the same group as an effective way to improve the molecular stability and affinity of the expressed protein.^{31;34;36;39}

Finally, even though it was possible to stain T cells with yeast expressing MHC class II molecules and analyze them by flow cytometry, we have been unable to activate the HA-specific cell line. Induction with yeasts loaded with HA-MHC complexes did not lead to CD25 or CD69 up-regulation on the T cells. One hypothesis to explain the result obtained with the yeast display system was the lack of motility of the displayed protein. In a physiological situation, many MHC class II molecules are known to cluster into the immunological synapse leading to cellular activation.⁶⁷⁻⁷⁰ However, this situation can not take place within the yeast display system because of the presence of covalent links between the α -agglutinin receptor and the β -glucan of the extracellular matrix of the cell wall preventing the free movement of the expressed MHC proteins.

7.4.6 Concluding Remarks

Our primary focus in engineering these molecules was the development of a screening tool allowing the identification new helper epitopes by the integration of cDNA libraries as coding sequence for the peptide. The results obtained clearly show that the yeast display system may provide an innovative tool capable of monitoring antigen-specific T lymphocytes. However, the random mutated approach might offer a good advantage to improve the protein stability and the proportion of correctly folded MHC in the yeast population in order to increase the specificity and the sensibility of the system.

7.4.7 Acknowledgements

We thank Dr André Darveau for his advice and helpful discussion and Serge Sénéchal for flow cytometry assistance. This work was supported by the NSERC grants.

Reference List

1. Mashishi, T. and C.M.Gray. 2002. The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin.Chem.Lab Med.* 40:903-910.
2. Jung, T., U.Schauer, C.Heusser, C.Neumann, and C.Rieger. 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 159:197-207.
3. Altman, J.D., P.A.Moss, P.J.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.
4. Ge, Q., J.D.Stone, M.T.Thompson, J.R.Cochran, M.Rushe, H.N.Eisen, J.Chen, and L.J.Stern. 2002. Soluble peptide-MHC monomers cause activation of CD8+ T cells through transfer of the peptide to T cell MHC molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:13729-13734.
5. Vandenberg, A.A., C.Rich, J.Mooney, A.Zamora, C.Wang, J.Huan, L.Fugger, H.Offner, R.Jones, and G.G.Burrows. 2003. Recombinant TCR Ligand Induces Tolerance to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein 35-55 Peptide and Reverses Clinical and Histological Signs of Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in HLA-DR2 Transgenic Mice. *J.Immunol.* 171:127-133.
6. Burrows, G.G., K.L.Adlard, B.F.Bebo, Jr., J.W.Chang, K.Tenditnyy, A.A.Vandenberg, and H.Offner. 2000. Regulation of encephalitogenic T cells with recombinant TCR ligands. *J.Immunol.* 164:6366-6371.
7. Burrows, G.G., B.F.Bebo, Jr., K.L.Adlard, A.A.Vandenberg, and H.Offner. 1998. Two-domain MHC class II molecules form stable complexes with myelin basic protein 69-89 peptide that detect and inhibit rat encephalitogenic T cells and treat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* 161:5987-5996.
8. Greten, T.F., J.E.Slansky, R.Kubota, S.S.Soldan, E.M.Jaffee, T.P.Leist, D.M.Pardoll, S.Jacobson, and J.P.Schneck. 1998. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:7568-7573.

9. Kuroda, M.J., J.E.Schmitz, D.H.Barouch, A.Craiu, T.M.Allen, A.Sette, D.I.Watkins, M.A.Forman, and N.L.Letvin. 1998. Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex. *J.Exp.Med.* 187:1373-1381.
10. Komanduri, K.V., S.M.Donahoe, W.J.Moretto, D.K.Schmidt, G.Gillespie, G.S.Ogg, M.Roederer, D.F.Nixon, and J.M.McCune. 2001. Direct measurement of CD4+ and CD8+ T-cell responses to CMV in HIV-1-infected subjects. *Virology* 279:459-470.
11. 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.* 192:63-75.
12. Wilson, J.D., G.S.Ogg, R.L.Allen, C.Davis, S.Shaunak, J.Downie, W.Dyer, C.Workman, S.Sullivan, A.J.McMichael, and S.L.Rowland-Jones. 2000. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS* 14:225-233.
13. Maini, M.K., C.Boni, G.S.Ogg, A.S.King, S.Reignat, C.K.Lee, J.R.Larrubia, G.J.Webster, A.J.McMichael, C.Ferrari, R.Williams, D.Vergani, and A.Bertoletti. 1999. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 117:1386-1396.
14. Romero, P., P.R.Dunbar, D.Valmori, M.Pittet, G.S.Ogg, D.Rimoldi, J.L.Chen, D.Lienard, J.C.Cerottini, and V.Cerundolo. 1998. 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.
15. Greten, T.F., F.Koranyi, G.Neumann, H.Wedemeyer, K.Schlote, A.Heller, S.Scheffer, D.M.Pardoll, A.I.Garbe, J.P.Schneck, and M.P.Manns. 2002. Peptide-beta2-microglobulin-MHC fusion molecules bind antigen-specific T cells and can be used for multivalent MHC-Ig complexes. *J.Immunol.Methods* 271:125-135.

16. Fahmy, T.M., J.G. Bieler, and J.P. Schneck. 2002. Probing T cell membrane organization using dimeric MHC-Ig complexes. *J. Immunol. Methods* 268:93-106.
17. Schneck, J.P. 2000. Monitoring antigen-specific T cells using MHC-Ig dimers. *Immunol. Invest* 29:163-169.
18. Greten, T.F., J.E. Slansky, R. Kubota, S.S. Soldan, E.M. Jaffee, T.P. Leist, D.M. Pardoll, S. Jacobson, and J.P. Schneck. 1998. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19-specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95:7568-7573.
19. Dal Porto, J., T.E. Johansen, B. Catipovic, D.J. Parfiit, D. Tuveson, U. Gether, S. Kozlowski, D.T. Fearon, and J.P. Schneck. 1993. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90:6671-6675.
20. Hamad, A.R., S.M. O'Herrin, M.S. Lebowitz, A. Srikrishnan, J. Bieler, J. Schneck, and D. Pardoll. 1998. Potent T cell activation with dimeric peptide-major histocompatibility complex class II ligand: the role of CD4 coreceptor. *J. Exp. Med.* 188:1633-1640.
21. Lebowitz, M.S., S.M. O'Herrin, A.R. Hamad, T. Fahmy, D. Marguet, N.C. Barnes, D. Pardoll, J.G. Bieler, and J.P. Schneck. 1999. Soluble, high-affinity dimers of T-cell receptors and class II major histocompatibility complexes: biochemical probes for analysis and modulation of immune responses. *Cell Immunol.* 192:175-184.
22. Cochran, J.R. and L.J. Stern. 2000. A diverse set of oligomeric class II MHC-peptide complexes for probing T-cell receptor interactions. *Chem. Biol.* 7:683-696.
23. Cameron, T.O., J.R. Cochran, B. Yassine-Diab, R.P. Sekaly, and L.J. Stern. 2001. 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.
24. Cochran, J.R., T.O. Cameron, and L.J. Stern. 2000. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity.* 12:241-250.

25. van Rensen,A.J., M.H.Wauben, M.C.Grosfeld-Stulemeyer, W.van Eden, and D.J.Crommelin. 1999. Liposomes with incorporated MHC class II/peptide complexes as antigen presenting vesicles for specific T cell activation. *Pharm.Res.* 16:198-204.
26. van Rensen,A.J., L.S.Taams, M.C.Grosfeld-Stulemeyer, W.van Eden, D.J.Crommelin, and M.H.Wauben. 2000. Induction of T cell anergy by liposomes with incorporated major histocompatibility complex (MHC) II/peptide complexes. *Pharm.Res.* 17:720-726.
27. Le Doussal,J., B.Piqueras, I.Dogan, P.Debre, and G.Gorochov. 2000. Phage display of peptide/major histocompatibility complex. *J.Immunol.Methods* 241:147-158.
28. Kurokawa,M.S., S.Ohoka, T.Matsui, T.Sekine, K.Yamamoto, K.Nishioka, and T.Kato. 2002. Expression of MHC class I molecules together with antigenic peptides on filamentous phages. *Immunol.Lett.* 80:163-168.
29. Boder,E.T. and K.D.Wittrup. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat.Biotechnol.* 15:553-557.
30. Wittrup,K.D. 2001. Protein engineering by cell-surface display. *Curr.Opin.Biotechnol.* 12:395-399.
31. Kieke,M.C., E.V.Shusta, E.T.Boder, L.Teyton, K.D.Wittrup, and D.M.Kranz. 1999. Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:5651-5656.
32. Kieke,M.C., E.Sundberg, E.V.Shusta, R.A.Mariuzza, K.D.Wittrup, and D.M.Kranz. 2001. High affinity T cell receptors from yeast display libraries block T cell activation by superantigens. *J.Mol.Biol.* 307:1305-1315.
33. Shusta,E.V., M.C.Kieke, E.Parke, D.M.Kranz, and K.D.Wittrup. 1999. Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency. *J.Mol.Biol.* 292:949-956.
34. Shusta,E.V., P.D.Holler, M.C.Kieke, D.M.Kranz, and K.D.Wittrup. 2000. Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nat.Biotechnol.* 18:754-759.

35. Holler, P.D., P.O. Holman, E.V. Shusta, S.O'Herrin, K.D. Wittrup, and D.M. Kranz. 2000. In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:5387-5392.
36. Boder, E.T., K.S. Midelfort, and K.D. Wittrup. 2000. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:10701-10705.
37. Kieckhefer, M.C., B.K. Cho, E.T. Boder, D.M. Kranz, and K.D. Wittrup. 1997. Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng* 10:1303-1310.
38. Boder, E.T. and K.D. Wittrup. 1998. Optimal screening of surface-displayed polypeptide libraries. *Biotechnol. Prog.* 14:55-62.
39. Boder, E.T. and K.D. Wittrup. 2000. Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol.* 328:430-444.
40. VanAntwerp, J.J. and K.D. Wittrup. 2000. Fine affinity discrimination by yeast surface display and flow cytometry. *Biotechnol. Prog.* 16:31-37.
41. Brophy, S.E., P.D. Holler, and D.M. Kranz. 2003. A yeast display system for engineering functional peptide-MHC complexes. *J. Immunol. Methods* 272:235-246.
42. Starwalt, S.E., E.L. Masteller, J.A. Bluestone, and D.M. Kranz. 2003. Directed evolution of a single-chain class II MHC product by yeast display. *Protein Eng* 16:147-156.
43. Rhode, P.R., M. Burkhardt, J. Jiao, A.H. Siddiqui, G.P. Huang, and H.C. Wong. 1996. Single-chain MHC class II molecules induce T cell activation and apoptosis. *J. Immunol.* 157:4885-4891.
44. Michel, F., G. Attal-Bonnefoy, G. Mangino, S. Mise-Omata, and O. Acuto. 2001. CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity.* 15:935-945.
45. Gorga, J.C., P.J. Knudsen, J.A. Foran, J.L. Strominger, and S.J. Burakoff. 1986. Immunochemically purified DR antigens in liposomes stimulate xenogeneic cytolytic T cells in secondary in vitro cultures. *Cell Immunol.* 103:160-173.

46. Radka, S.F., C.E. Machamer, and P. Cresswell. 1984. Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and Western blotting. *Hum. Immunol.* 10:177-186.
47. Murthy, V.L. and L.J. Stern. 1997. The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding. *Structure.* 5:1385-1396.
48. Sato, A.K., J.A. Zarutskie, M.M. Rushe, A. Lomakin, S.K. Natarajan, S. Sadegh-Nasseri, G.B. Benedek, and L.J. Stern. 2000. Determinants of the peptide-induced conformational change in the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR1. *J. Biol. Chem.* 275:2165-2173.
49. Zarutskie, J.A., A.K. Sato, M.M. Rushe, I.C. Chan, A. Lomakin, G.B. Benedek, and L.J. Stern. 1999. A conformational change in the human major histocompatibility complex protein HLA-DR1 induced by peptide binding. *Biochemistry* 38:5878-5887.
50. Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
51. Posch, P.E., A.E. Hastings, S. Rosen-Bronson, J.R. Richert, and C.K. Hurley. 1996. The relative importance of individual DR binding motif positions as defined by peptide anchor analysis of influenza hemagglutinin peptide 306-318 and human myelin basic protein peptide 152-165 binding to several DR molecules: definition of a common extended DR binding motif. *Eur. J. Immunol.* 26:1884-1891.
52. Hennecke, J., A. Carfi, and D.C. Wiley. 2000. Structure of a covalently stabilized complex of a human alpha beta T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1. *EMBO J.* 19:5611-5624.
53. Fremont, D.H., W.A. Hendrickson, P. Marrack, and J. Kappler. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272:1001-1004.
54. 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.

55. Rhode, P.R., M. Burkhardt, J. Jiao, A.H. Siddiqui, G.P. Huang, and H.C. Wong. 1996. Single-chain MHC class II molecules induce T cell activation and apoptosis. *J. Immunol.* 157:4885-4891.
56. Kim, S.T. and S.M. Byun. 2000. Modulation of the peptide-binding specificity of a single-chain class II major histocompatibility complex. *J. Biochem. (Tokyo)* 128:449-454.
57. Hammer, J., C. Belunis, D. Bolin, J. Papadopoulos, R. Walsky, J. Higelin, W. Danho, F. Sinigaglia, and Z.A. Nagy. 1994. High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91:4456-4460.
58. Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
59. Chang, J.W., D.E. Mechling, H.P. Bachinger, and G.G. Burrows. 2001. Design, engineering, and production of human recombinant T cell receptor ligands derived from human leukocyte antigen DR2. *J. Biol. Chem.* 276:24170-24176.
60. Vandembark, A.A., C. Rich, J. Mooney, A. Zamora, C. Wang, J. Huan, L. Fugger, H. Offner, R. Jones, and G.G. Burrows. 2003. Recombinant TCR Ligand Induces Tolerance to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein 35-55 Peptide and Reverses Clinical and Histological Signs of Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in HLA-DR2 Transgenic Mice. *J. Immunol.* 171:127-133.
61. Burrows, G.G., K.L. Adlard, B.F. Bebo, Jr., J.W. Chang, K. Tenditny, A.A. Vandembark, and H. Offner. 2000. Regulation of encephalitogenic T cells with recombinant TCR ligands. *J. Immunol.* 164:6366-6371.
62. Burrows, G.G., B.F. Bebo, Jr., K.L. Adlard, A.A. Vandembark, and H. Offner. 1998. Two-domain MHC class II molecules form stable complexes with myelin basic protein 69-89 peptide that detect and inhibit rat encephalitogenic T cells and treat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 161:5987-5996.
63. Cho, B.K., M.C. Kieckhefer, E.T. Boder, K.D. Wittrup, and D.M. Kranz. 1998. A yeast surface display system for the discovery of ligands that trigger cell activation. *J. Immunol. Methods* 220:179-188.

64. Vest,H.N., P.L.Ostergaard, A.Stryhn, and S.Buus. 2001. Phage display of peptide / major histocompatibility class I complexes. *Eur.J.Immunol.* 31:32-38.
65. Kieke,M.C., E.V.Shusta, E.T.Boder, L.Teyton, K.D.Wittrup, and D.M.Kranz. 1999. Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:5651-5656.
66. Griffin,M.D., P.O.Holman, Q.Tang, N.Ashourian, U.Korthauer, D.M.Kranz, and J.A.Bluestone. 2001. Development and applications of surface-linked single chain antibodies against T-cell antigens. *J.Immunol.Methods* 248:77-90.
67. Lindstedt,R., N.Monk, G.Lombardi, and R.Lechler. 2001. Amino acid substitutions in the putative MHC class II "dimer of dimers" interface inhibit CD4+ T cell activation. *J.Immunol.* 166:800-808.
68. Schafer,P.H., S.Malapati, K.K.Hanfelt, and S.K.Pierce. 1998. The assembly and stability of MHC class II-(alpha beta)₂ superdimers. *J.Immunol.* 161:2307-2316.
69. Schafer,P.H., S.K.Pierce, and T.S.Jardetzky. 1995. The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers. *Semin.Immunol.* 7:389-398.
70. Schafer,P.H. and S.K.Pierce. 1994. Evidence for dimers of MHC class II molecules in B lymphocytes and their role in low affinity T cell responses. *Immunity.* 1:699-707.

Figure 9: MHC class II single chain construct cloned into the pYD1 yeast display vector. The HA peptide was covalently linked to the β chain of the MHC class II with a 15 amino acid residue linker (Gly₄Ser)₃ (Linker 1). The β chain was covalently linked to the α chain with a 20 amino acid residue linker (Gly₄Ser)₄ (Linker 2) or with a 5 amino acid linker (Gly₄Ser)₁ (Linker 3). V5 is a 14 amino acid epitope tag. AGA2p is the yeast mating factor subunit that allows surface display through disulfide bonds to the AGA1p subunit.

Figure 10: Evaluation of recombinant peptide-MHC expression on yeast surface. Immunofluorescence staining of Peptide/MHC complexes displayed on the surface of yeast. Surface expression of the HA-MHC class II molecules were detected by using a non-conformational antibody, anti-V5 (a tag epitope at the carboxy terminus of scMHC class II) or XD5 which can recognize native and denatured forms of the MHC molecule and by using two different conformational antibodies for MHC class II (L243 and LB3.1). In A, V5, XD5 and L243 staining are in purple and negative control are in green. Following staining, yeast were analyzed either by flow cytometry in A or by fluorescence microscopy in B. Solubilized MHC class II molecules expressed at the surface of the yeast were analyzed by Western blot in C. Two different antibodies, anti-V5, and a MHC class II specific polyclonal anti- β chain were used to confirm that the peptide-MHC complex migrated to the expected molecular weight. Solubilized AGA2 protein was used as positive control for V5 staining and as negative control for anti-MHC class II β chain staining. Single chain protein of HA-MHC class II was used as negative control for V5 staining and as positive control for anti- β chain staining. Solubilized fractions from two different colonies of yeast transformed with construct 3 were loaded (1 and 2). Red arrows show the bands corresponding to AGA2p fused with HA-MHC class II.

Figure 11: Staining of Jurkat T cells by yeast expressing HA-MHC class II molecules. **A)** Flow cytometric analysis of conjugate formation between either relevant A14 or irrelevant E6.1 Jurkat cells and either yeast expressing construct 3 or 4. **B)** Visualization of conjugate formation between yeast and Jurkat cells by fluorescence microscopy.

Figure 12: Inhibition of Yeast-Jurkat conjugate formation by antibody competition. Jurkat cells were pre-incubated with either anti-TCR or anti-CD4 antibodies. Both antibodies lead to an inhibition in a dose dependant manner while no inhibition was seen when isotypic antibodies or irrelevant anti-MHC class I antibody were used.

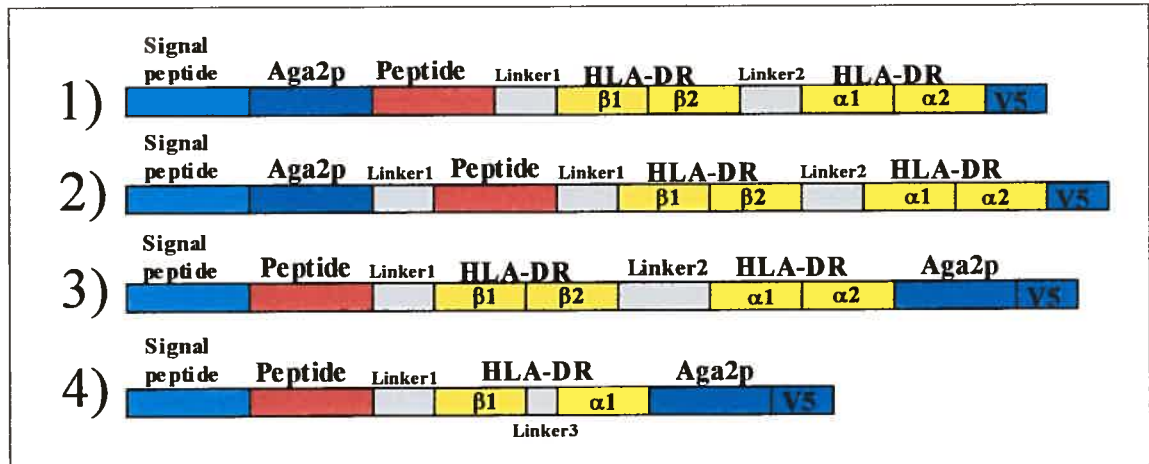


Figure 9

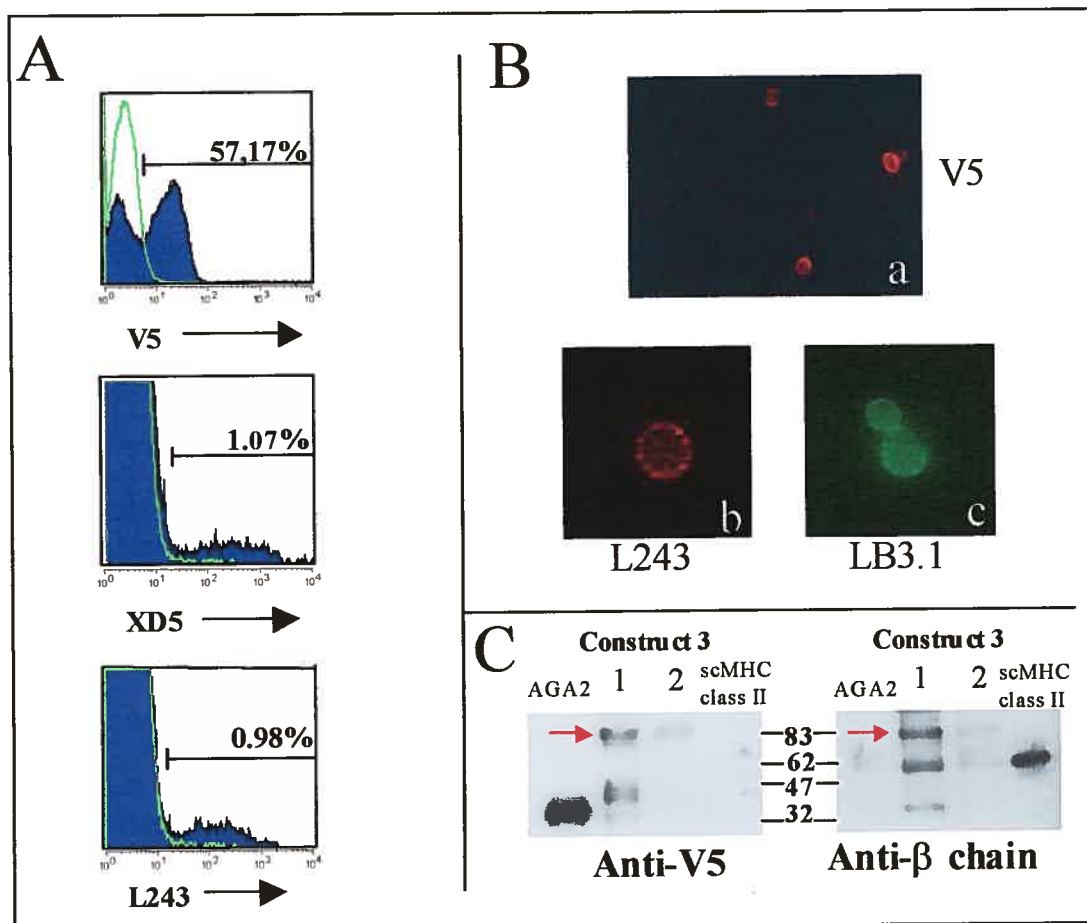


Figure 10

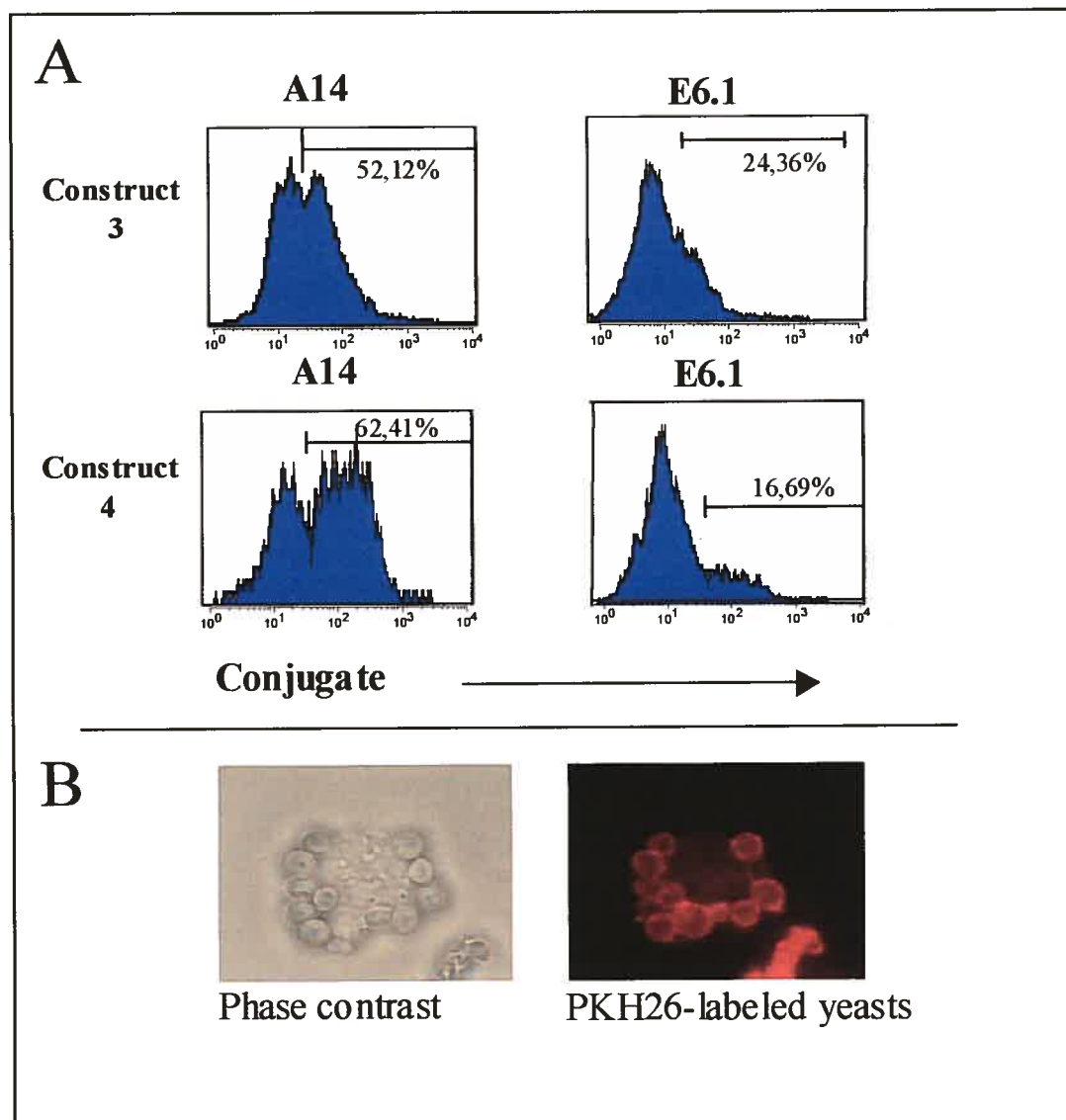


Figure 11

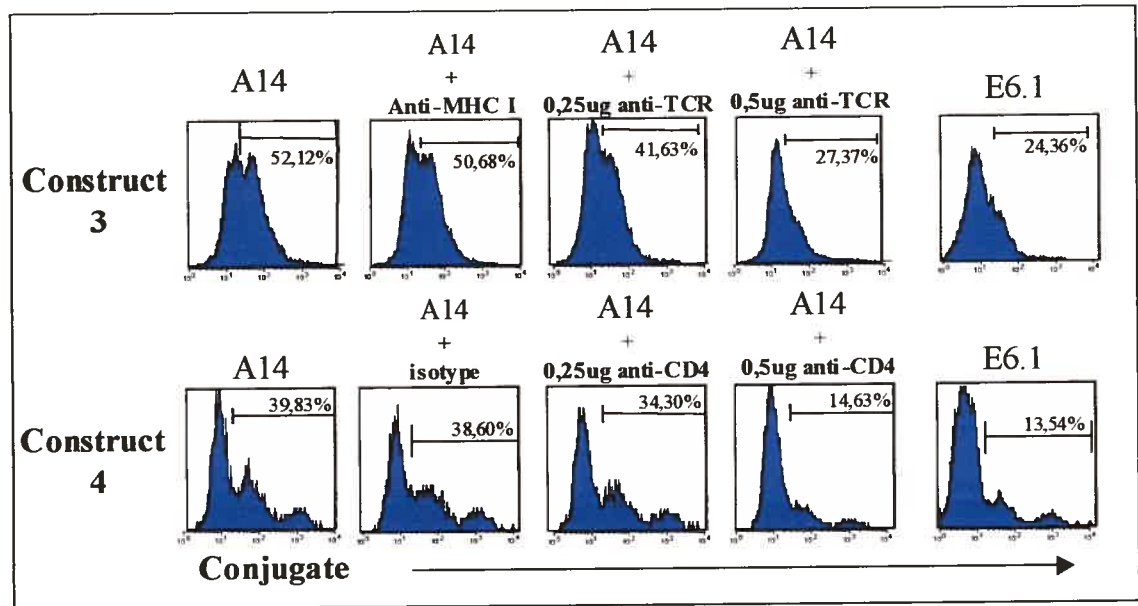


Figure 12

Chapitre III

Discussion

8. Discussion

Le but ultime de ce projet étant le développement d'un outil permettant la découverte de nouveaux épitopes, tous les choix ont donc été orientés pour permettre l'expression d'une librairie peptidique liée de façon covalente aux molécules de CMH de classe II. Il doit être également possible d'identifier par PCR ou RT-PCR la séquence d'ADNc préalablement clonée pour ainsi identifier le peptide présenté dans la molécule de CMH de classe II. Pour y parvenir, le système doit permettre une interaction suffisamment stable entre les lymphocytes T CD4⁺ et les multimères de CMH afin d'effectuer des tris en cytométrie de flux. Finalement, la multimérisation des CMH étant très importante sur le degré d'avidité de la liaison CMH-TCR, seuls les systèmes permettant l'expression de nombreuses molécules de CMH ont été sélectionnés.

8.1 Constructions

La première étape a donc été la construction d'une molécule de CMH de classe II possédant un peptide lié de façon covalente à la chaîne β du CMH. La liaison covalente du peptide à la chaîne β du CMH a deux rôles. Tout d'abord, la liaison du peptide dans la niche peptidique résulte en une stabilisation de la molécule de classe II. De plus, cela permet l'intégration de banques d'ADNc servant de séquence codant pour un futur épitope. Plusieurs études ont démontré que la présence du "linker" n'affectait pas la reconnaissance du peptide-CMH par le TCR.^{108;110;113} Cunliffe *et al.* ont démontré qu'il était possible d'optimiser le "linker" présent entre le peptide et la chaîne β .¹³⁷ Bien que la stabilité des molécules tétramériques soit améliorée par le nouveau "linker" peu de changements sont observés quant à la sensibilité et la spécificité des tétramères dans la détection des cellules T.

La seconde étape consiste à évaluer l'efficacité des systèmes utilisés pour exprimer des molécules de CMH en une conformation adéquate permettant une interaction entre les complexes peptide-CMH et leur TCR respectifs. Pour ce faire, nous avons utilisé le peptide modèle HA compte tenu des nombreuses publications concernant ce peptide. De plus, il a été possible de comparer le système d'expression de CMH de classe II en levures avec celui des tétramères de classe II.

Le système d'expression en levures pYD1 utilise une fusion avec la sous-unité Aga2p de l' α -agglutinine pour permettre l'expression en surface des protéines. Par conséquent, les régions transmembranaires et cytoplasmiques des chaînes α et β du CMH de classe II ont été enlevées pour ne conserver que les domaines α 1- α 2 et β 1- β 2 des chaînes α et β respectivement. Par la suite, les chaînes α et β ont été fusionnées par l'ajout d'une séquence polypeptidique composée de glycines et de sérines ((G₄S)₃) entre les domaines β 2 et α 1 (Voir figure 9). Ici aussi il aurait été possible de modifier le linker présent entre les deux chaînes du CMH de façon à influencer positivement l'expression de CMH de classe II.

Finalement, un autre type de construction de classe II a également été réalisé. Il s'agit d'une adaptation de molécules solubles de CMH de classe II qui a déjà été produite en levure *P. pastoris*. Il s'agit d'une forme tronquée de molécules de classe II où seuls les domaines variables α 1 et β 1 ont été conservés (voir figure 9). Le but de cette construction était de réduire la taille des molécules de CMH pour en faciliter l'expression. Bien que l'effet opposé a été observé, les molécules de CMH tronquées et exprimées en levures semblent tout aussi efficaces dans la détection de cellules T.

8.2 Vecteurs

Le vecteur pYD1 utilisé dans ce projet permet l'expression de protéines du côté carboxy-terminal de la protéine Aga2p (ANNEXE 2). Parmi les différentes possibilités, deux approches ont été réalisées avec le vecteur pYD1 original. Premièrement, la molécule HA-HLA-DR1 a été clonée dans le site de clonage multiple du vecteur (*BamH1* et *EcoR1*) et dans un site de restriction situé en aval d'un "linker" flexible de polyglycines (site *Nhe1*). Malheureusement, tous les sites de restriction permettant le clonage de molécules dans le vecteur pYD1 sont situés du côté 3' de la séquence codant pour la Aga2p. Ceci implique que le peptide, normalement libre de toute fusion du côté 5', est en fusion avec la partie terminale de la protéine Aga2p. De plus, il faut ajouter que le côté 3' du peptide est relié à la molécule de CMH par un "linker". Étant donnée l'importance de la poche d'ancrage P1, (côté 5' du peptide) une modification a été apportée au vecteur d'origine pYD1 afin de permettre le clonage des molécules de CMH du côté 5' de la séquence codant pour la AGA2p.

Le vecteur commercial a donc été modifié de façon à permettre l'expression de la protéine recombinante du côté N-terminal. Pour ce faire, un site de restriction a été ajouté entre la séquence codant pour le peptide signal et la protéine Aga2p. Le site de restriction introduit est localisé entre le site de clivage du peptide signal et la protéine AGA2. Par conséquent, les molécules de CMH ainsi clonées sont exprimées du côté N-terminal de la protéine AGA2 et le clivage du peptide signal lors de la maturation des protéines libère le côté 5' du peptide. Ce type de modification permettant la fusion de protéine en 5' avec l'AGA2p a d'ailleurs été utilisé récemment par Kranz et ses collaborateurs pour l'expression de molécules de classe I.⁹⁰ Dans notre cas, les deux types de constructions, soit la version pleine longueur et la version tronquée du CMH de classe II, ont été exprimées à l'aide du vecteur pYD1 modifié. (voir figure 9)

Quel que soit le vecteur utilisé, original ou modifié, tous ont été en mesure de permettre l'expression de molécules de classe II en surface des levures. Par contre, le repliement des molécules de CMH ne semble pas optimal. Bien que le vecteur pYD1 modifié donne de meilleurs résultats avec les anticorps conformationnels anti-HLA-DR, d'autres constructions de classe II doivent être envisagées afin d'augmenter le pourcentage de levures reconnues par les anticorps anti-CMH de classe II.

L'approche des mutations aléatoires utilisée par Kranz et Wittrup afin d'augmenter l'affinité et l'avidité des molécules exprimées en levures pour leurs ligands serait tout à fait appropriée pour ce projet. Cette méthode, consiste à créer une banque relativement importante de constructions mutées de CMH ou de toutes autres molécules. Par la suite, on sélectionne les mutations favorables par des tris successifs en cytométrie de flux basés sur l'affinité des molécules exprimées pour leur ligand. Il est ainsi possible d'obtenir, à la suite de quelque tris successifs, une population cellulaire homogène exprimant des molécules possédant une affinité beaucoup plus grande pour leurs ligands que les molécules sans mutation. Évidemment, la séquence d'ADN ayant codé pour les molécules de CMH produites de cette façon doit être séquencée pour s'assurer que les mutations n'ont pas affecté la niche peptidique ou les régions reconnues par le TCR par exemple. De plus, le nombre de mutation obtenu par cette technique est aléatoire, entre 3 et 8 mutations par molécule de CMH.¹³⁴ Il est donc relativement difficile de connaître l'effet exact de chaque mutation sur la structure des CMH. Par contre, certaines mutations sont beaucoup plus fréquentes chez les clones ayant été reconnus par des anticorps conformationnels anti-CMH. Les acides aminés His₅₆ et Ser₅₇ de la chaîne β du CHM murin I-A^{g7} représentent la région du CMH de classe II où les mutation surviennent le plus fréquemment. Cependant, ces deux acides aminés ne sont pas conservés entre les chaînes HLA-DR1 humain et l'allèle I-A^{g7} de souris. C'est d'ailleurs le cas d'un bon nombre de mutations retrouvées tant dans les chaînes α que β (Annexe 3). Le deuxième point à souligner est que les acides aminés β 56-

57 correspondent à des acides aminés constituant la niche peptidique. Bien que leur positions correspondent à la poche 9 et que l'influence de cette poche sur la liaison peptide-CMH est faible, ceci influencera tout de même le répertoire des peptides présentés par ces molécules de CMH. De plus, ceci influencera le niveau l'interaction du complexe peptide-CMH sur le TCR en augmentant ou en diminuant la réactivité des lymphocytes T face à un épitope. Par conséquent, les mutations β 56-57 proposées par Kranz et ses collègues pour stabiliser les molécules de CMH de classe II ont été rejetées en raison de la modification qu'elles entraînent sur la niche peptidique.

Finalement, grâce à l'intérêt porté par plusieurs groupes pour l'utilisation du "yeast display" de nouveaux systèmes d'expression ont été développés pour permettre l'expression de protéines ancrées à la surface des levures. D'ailleurs, une étude récente a utilisé un vecteur alternatif utilisant un "glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-anchored protein" pour exprimer ces protéines. Il s'agit d'une approche intéressante car le vecteur permet le clonage et l'expression de la protéine recombinante du côté 3' contrairement au vecteur pYD1 qui a dû être modifié pour permettre ce type d'expression. De plus, ce système utilise une autre espèce de levure soit *Hansenula polymorpha*.¹³⁸ Finalement, d'autres de vecteur d'expression en surface de levures ont maintenant fait leur apparition.^{139;140} Tous les nouveaux systèmes ont démontrés qu'il était possible d'exprimer des protéines en surface et que ces protéines possédaient toutes leurs propriétés natives.

8.3 Systèmes d'expression

8.3.1 Bactéries

Nos premières tentatives de production de molécules recombinantes peptide-CMH ont été réalisées dans la bactérie *E. coli*. Le but de cette production en bactérie était de vérifier s'il était techniquement possible de produire des peptides-CMH solubles à l'aide d'un système procaryote tout en conservant les propriétés natives des CMH suite à un repliement *in vitro*. Bien qu'il a été possible de produire des molécules de CMH en conformation native en *E. coli*, l'étape du repliement *in vitro* des protéines demeure très limitante. (Annexe 4) Cette méthode de production à partir d'une fusion peptide-CMH ce voulait une alternative pour la production de molécules tétramériques de CMH. Malheureusement, le rendement obtenu à partir d'une production en bactérie lorsque les chaînes α et β sont indépendantes est supérieur à celui obtenu avec la fusion peptide-CMH de classe II. Bien que les rendements de production soient faibles, la réussite obtenue avec ce système de production suggérait fortement que la construction HA-CMH pouvait être utilisée dans d'autres systèmes d'expression.

8.3.2 Bactériophages

Notre premier choix pour la création de multimères de CMH fût un système d'expression en surface de phages. Comme ce système avait déjà été décrit dans la littérature pour son efficacité dans l'expression des CMH de classe I⁸⁷, notre but a été de transposer ce système pour l'expression de CMH de classe II. Cependant, les difficultés rencontrées lors de la fabrication des CMH de classe II, que ce soit en bactérie ou dans tout autre système d'expression, semblent être toujours présentes lors de l'expression en surface de phages. Contrairement à Gorochov et son groupe, l'approche

utilisée a été celle d'une fusion avec la protéine gp8 du phage filamenteux FD-88 type 4. La plupart des groupes utilisent la protéine gp3 permettant l'expression de 3 à 5 protéines recombinantes. Le système du phage FD-88 type 4 utilise une fusion avec la protéine gp8 du phage et permet l'expression de 200 à 300 molécules recombinantes par phage. Évidemment, le but d'une telle fusion est d'augmenter le nombre de molécules de CMH disponibles pour interagir avec les TCR. Malheureusement, plusieurs problèmes ont été rencontrés dont la très faible quantité d'ADN produite lors du cycle de réplication du phage ce qui rend plus difficile les manipulations d'ADN. De plus, les protéines produites par la technologie du "phage display" sont synthétisées à l'intérieur du *E. coli* et par conséquent, les protéines ainsi fabriquées ne subissent pas les modifications post-traductionnelles retrouvées chez les cellules eucaryotes tel que la glycosilation.

Suite aux difficultés rencontrées, c'est-à-dire l'incapacité de produire des CMH de classe II en surface de phages qui puissent être reconnus par des TCR ou des anticorps conformationnels (données personnelles), nous avons pris la décision d'exclure les phages comme outil pour la fabrication de multimères de CMH.

8.3.3 Levures

Parmi les caractéristiques favorisant le système pYD1 d'expression en levures notons, entre autres, le fait que ce système d'expression est eucaryote. On y retrouve donc la glycosylation et la formation de ponts disulfures sur les protéines nouvellement synthétisées. De plus, une des caractéristiques importantes de ce système est qu'il permet l'expression de 10000 à 30000 molécules recombinantes en surface. Ce nombre important de molécules exprimées en fait un système idéal pour la création d'un multimère de CMH de classe II.

La production de CMH de classe II en levures a été démontrée en 1996 par l'expression de molécules recombinantes HLA-DR2 solubles en levures méthylophiles *Pichia pastoris*.¹²³ Pour y arriver, ce groupe a remplacé les régions trans-membranaires des molécules de CMH par un "leucine zipper". De plus, le groupe de Wittrup a réussi à exprimer des protéines relativement complexes telles que des TCR^{133;141;142} ou des anticorps^{143;144} en surface de levures *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, ce même groupe a démontré, par la formation de conjugués, la présence d'interactions spécifiques entre des levures exprimant des anticorps dirigés contre le domaine V β du TCR et des lymphocytes T.¹⁴⁵ Étant donné les réussites de ces groupes avec le système d'expression en levures, l'option des levures comme système de production de molécules multimériques de CMH de haute densité a été le choix de remplacement suite à l'échec obtenu avec les bactériophages.

Plusieurs qualités retrouvées chez les levures en font un bon candidat comme système d'expression pour la fabrication de multimères de CMH. Parmi ces qualités, notons la rapidité de croissance de ces organismes comparé aux autres cellules eucaryotes utilisées dans la production de dimères et tétramères de CMH. Il est ainsi possible de produire à peu de frais une grande quantité de protéines en seulement quelques jours, généralement en moins de 72 heures, tout en évitant de lourdes manipulations associées à la culture cellulaire. De plus, les levures sont des organismes très robustes, ce qui facilite leur manipulation lors des marquages et analyses de cytométrie en flux. Évidemment, on retrouve également quelques désavantages associés aux levures. Des problèmes de repliement de certaines protéines produites en levures ont d'ailleurs été décrits.¹⁴⁶ De plus, pratiquement l'ensemble des protéines produites et exprimées en surface de levure *S. cerevisiae* ont été réalisées grâce à une approche de mutagenèse aléatoire permettant l'expression de protéines bien repliées.^{90;132-134;141-143;147-149}

Compte tenu des objectifs spécifiques de ce projet, le système d'expression en levures pYD1 d'Invitrogen était le seul vecteur permettant l'expression de protéines recombinantes ancrées à la surface cellulaire. De plus, aucun autre système, en théorie, n'offre autant d'avantages que l'expression en surface de levures.

8.4 Expression des CMH de classe II en surface de levures

Les résultats obtenus permettent de conclure qu'il est possible d'exprimer des molécules de classe II en surface des levures à l'aide d'une fusion avec l' α -agglutinine des levures. De plus, les modifications apportées au vecteur permettant une fusion en N-terminal ne semblent pas affecter l'expression en surface des protéines.

La présence de CMH à la surface des levures a été démontrée par cytométrie en flux et par microscopie. Dans le premier cas, il est possible d'acquérir une grande quantité d'événements permettant de faire des analyses statistiques. La microscopie, elle, a permis de visualiser les protéines directement à la surface des levures. Les résultats obtenus en FACS, toutes constructions confondues, démontrent que les CMH sont bel et bien présents à la surface cellulaire. Cependant, le très faible pourcentage obtenu avec les anticorps conformationnels anti-classe II indique que les CMH ne sont pas dans une conformation optimale. Par contre, l'expression des CMH avec le vecteur modifié de façon à permettre l'expression du CMH en N-Terminal de l' α -agglutinine permet d'obtenir de meilleurs résultats avec les anticorps anti-CMH de classe II.

Une analyse biochimique a également été réalisée sur les CMH exprimés à la surface des levures. La liaison des protéines de fusion à la surface cellulaire étant assurée par des ponts disulfures, il est possible de couper ces liens à l'aide d'un agent réducteur et ainsi faire l'analyse des CMH. Malheureusement, l'utilisation d'agent réducteur tel que le DTT pour couper les ponts entre les CMH et la Aga1p affecte également les ponts

disulfures présents dans la structure du CMH de classe II. Il est donc impossible de vérifier la stabilité des complexes peptide-CMH en gel SDS-PAGE. La stabilité en gel SDS permet de distinguer deux différentes conformations des CMH soit: une conformation compacte de 56 kDa ou une conformation relâchée de 65 kDa.¹⁵⁰ C'est la présence du peptide dans la niche peptidique qui assure la stabilité en gel SDS. Dans le cas du peptide HA₃₀₆₋₃₁₈ et de la molécule HLA-DRβ0101, c'est la présence d'acides aminés aromatiques ou aliphatiques dans la poche d'ancrage P1 qui est responsable de cette stabilité en gel SDS.¹⁵¹ Cette méthode de vérification basée sur la structure compacte ou non des complexes HA-CMH ne pouvant être faite, il a donc été impossible de démontrer la présence d'indices permettant de croire que le peptide se retrouve dans la niche peptidique. Les analyses effectuées en FACS à l'aide d'un anticorps reconnaissant les CMH de classe II vide (KL304)¹⁵² n'ont donné aucun signal. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat: Soit que les peptides sont présents dans la niche peptidique et masquent ainsi les sites de liaison de l'anticorps ou soit que les CMH soient mal repliés en surface ce qui entrave la reconnaissance des sites normalement retrouvés dans la structure des classe II.

8.5 Interaction entre les levures-CMH et les lymphocytes T

Le protocole utilisé pour la fabrication de conjugués provient d'une adaptation de plusieurs méthodes. Premièrement, l'utilisation de levures comme CPA pour activer des lymphocytes T a déjà été décrit en 1998.¹⁴⁵ De plus, plusieurs groupes ont décrit la fabrication de conjugués entre divers types cellulaires, il a donc été relativement facile d'adapter les protocoles existants pour la fabrication de conjugués entre les levures et les lymphocytes T.¹⁵³⁻¹⁵⁶ Même si la plupart des protocoles utilisent deux fluorochromes, un pour être en mesure de distinguer les populations cellulaires et l'autre pour visualiser la formation de conjugués, il a été possible dans notre cas d'utiliser un seul fluorochrome. En effet, la

différence de taille entre les levures et les lymphocytes T (profil FSC versus SSC) est suffisamment grande pour utiliser ce critère afin de séparer les deux populations cellulaires. Par conséquent un seul fluorochrome peut être utilisé pour permettre la visualisation de conjugués entre les levures et les cellules T.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux démontrent qu'il est techniquement possible d'utiliser les levures exprimant des classe II comme sonde pour cribler des populations de lymphocytes T. Malheureusement, la très faible quantité de levures exprimant des classes II pouvant être reconnues par des anticorps conformationnels semble rendre cette approche très difficile. Par exemple, la formation de conjugués entre les levures et les Jurkats doit être forcée par une très brève centrifugation suivie d'une incubation à 37°C. Une trop forte centrifugation ou des temps d'incubation trop longs résultent en un bruit de fond beaucoup trop élevé pour permettre une analyse des résultats alors que des temps trop courts résultent en une inefficacité du système pour détecter les lymphocytes T. De plus, on retrouve une certaine variabilité lors de chaque induction de protéine. Bien que cette variation soit généralement minime, elle influence grandement les ratios levures par Jurkats, le temps d'incubation à 37°C et la durée de centrifugation lors de la fabrication de conjugués entre les levures et les Jurkats. Par conséquent, chaque induction de levures doit être accompagnée d'une cinétique de centrifugation et d'incubation. Ceci alourdit grandement l'utilisation des levures de façon courante pour des analyses en cytométrie de flux, d'autant plus que leur efficacité n'est pas supérieure à celle des tétramères de CMH de classe II.

8.6 Colorants

Le colorant utilisé pour créer des sondes fluorescentes avec les levures est le PKH26^{157;158}. Ce colorant lipophile est tout à fait approprié pour le marquage des levures compte tenu de l'épaisse paroi de ces organismes. Cependant, l'aspect lipophile de ce colorant cause un léger problème de diffusion non spécifique du colorant à l'intérieur des lymphocytes T CD4+ lors des temps d'incubation prolongés à 37°C. Ce problème a été réglé en augmentant le nombre de lavages après coloration. Malgré tout, l'utilisation d'un colorant ne diffusant pas de façon passive ou créant des liens stables après pénétration dans la cellule serait souhaitable. Il existe une vaste gamme de colorants décrit dans la littérature pouvant être utilisés pour rendre les levures observables en cytométrie de flux.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Il serait également possible d'effectuer une co-transfection avec un vecteur codant pour la GFP.^{162;163} La faisabilité d'une fusion GFP avec l' α -agglutinine de *S.cerevisiae* a d'ailleurs été démontré par divers groupes.^{164;165} Des agents intercalant l'ADN seraient tout à fait appropriés si ce n'était le fait que la plupart d'entre eux doivent être excités par des longueurs d'onde près des U.V. et que ce type de longueur d'onde n'est malheureusement pas disponible sur tous les cytomètres en flux.

8.7 Analyse

Bien que le niveau de bruit de fond est relativement élevé avec des lymphocytes T non spécifiques au peptide HA, la différence retrouvée lorsque les lignées spécifiques sont utilisées est suffisamment élevée en terme de pourcentage pour conclure en un apport de liaisons spécifiques entre les CMH et les TCR. Afin de s'assurer que la majeure partie du signal observé provient bel et bien d'une interaction spécifique, nous avons effectué une compétition avec des anticorps dirigés contre les TCR ou les molécules de CD4. Les résultats obtenus démontrent qu'une partie du signal

provient effectivement de la liaison entre les CMH exprimés à la surface des levures et les TCR des Jurkats. En plus de l'inhibition observée avec deux différents anticorps (anti-CD4, anti-TCR), il aurait été également possible d'utiliser le peptide HA afin de vérifier si sa présence pouvait induire une inhibition significative de l'interaction observée entre les levures et les cellules A14. De plus, il serait essentiel de reproduire une dernière fois cette expérience puisque cette dernière n'a été répétée que deux fois. Le travail doit donc être poursuivi... Finalement, on voit clairement qu'il y a deux populations de cellules positives dans les expériences de conjugaison faites avec la construction 4 (FIGURE 12). L'origine de la population de plus forte intensité semble être un artéfact. En effet, cette population n'a été observée que de très rares fois et sa présence est observée tant pour les cellules A14 que E6.1 (FIGURE 12 construction 4). Il est donc possible de croire que les cellules A14 et E6.1 ne sont pas en cause et que les levures exprimant la construction 4 sont probablement à l'origine de ces deux populations. L'hypothèse serait une mauvaise conservation des levures suite à leur induction au galactose. Étant donné le très long temps d'induction (~96h) et la conservation des levures à 4°C pour environ une semaine avant les analyses, il est possible qu'une dégradation des molécules en surface soit à l'origine d'une deuxième population positive de forte intensité. Cependant, d'autres analyses seront nécessaires afin de vérifier la stabilité des molécules exprimées en surface et l'influence de la conservation à long terme des levures sur la détection des lymphocytes T.

Notre incapacité d'activer des lymphocytes T CD4⁺ à l'aide des CMH de classe II exprimés en surface de levure a également été soulevé par Boder E.T. (compte rendu de conférence, Annual meeting Protein engineering 2002). Ce groupe utilise le même peptide modèle, mais présenté dans le contexte de la molécule HLA-DR4. L'hypothèse de la non motilité des protéines exprimées en surface des levures a également été mise en cause pour expliquer l'incapacité des levures à activer des lymphocytes T.

8.8. Conclusion générale

L'expression de CMH de classe II à la surface des levures constitue un nouvel outil permettant l'analyse de populations de lymphocytes T CD4+. Son utilisation à grande échelle en tant que réactif contre des TCR spécifiques, à l'image des tétramères de classe II, est tout à fait possible à condition d'augmenter l'avidité des CMH présentés à la surface. Comme il a déjà été mentionné, l'approche de la mutagenèse aléatoire semble être la plus appropriée.

Une fois les problèmes d'affinité et d'avidité du CMH améliorés, ce système pourrait tout à fait servir d'outil de criblage d'épitopes. De plus, comme ce système permet l'expression d'un très grand nombre de molécules de CMH (entre 10000 à 30000 molécules), ce système pourrait permettre la détection de lymphocytes exprimant un TCR de très faible affinité pour un antigène.

Il pourrait également être envisageable d'exprimer d'autres molécules telles que des molécules de co-stimulation avec les CMH pour ainsi créer des CPA artificielles. Ce système pourrait également servir de vecteur d'épitopes et d'adjuvants dans le développement d'un vaccin.¹⁶⁶

Liste de Références

1. Beck,S. and J.Trowsdale. 1999. Sequence organisation of the class II region of the human MHC. *Immunol.Rev.* 167:201-210.
2. Kumnovics,A., T.Takada, and K.F.Lindahl. 2003. Genomic organization of the Mammalian MHC. *Annu.Rev.Immunol.* 21:629-657.
3. Marsh,S.G., E.D.Albert, W.F.Bodmer, R.E.Bontrop, B.Dupont, H.A.Erich, D.E.Geraghty, J.A.Hansen, B.Mach, W.R.Mayr, P.Parham, E.W.Petersdorf, T.Sasazuki, G.M.Schreuder, J.L.Strominger, A.Svejgaard, and P.I.Terasaki. 2002. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Hum.Immunol.* 63:1213-1268.
4. Charron,D.J., P.Hermans, V.Lotteau, B.Merlu, F.Amesland, P.Turmel, and L.Tevton. 1990. Interisotypic alpha- and beta-chain assembly as a source of HLA class-II diversity. *Immunol.Res.* 9:234-243.
5. Lotteau,V., L.Teyton, D.Burroughs, and D.Charron. 1987. A novel HLA class II molecule (DR alpha-DQ beta) created by mismatched isotype pairing. *Nature* 329:339-341.
6. Brown,J.H., T.Jardetzky, M.A.Saper, B.Samraoui, P.J.Bjorkman, and D.C.Wiley. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332:845-850.
7. Kralovicova,J., S.G.Marsh, M.J.Waller, L.Hammarstrom, and I.Vorechovsky. 2002. The HLA-DRA*0102 allele: correct nucleotide sequence and associated HLA haplotypes. *Tissue Antigens* 60:266-267.
8. Madden,D.R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu.Rev.Immunol.* 13:587-622.
9. Brown,J.H., T.S.Jardetzky, J.C.Gorga, L.J.Stern, R.G.Urban, J.L.Strominger, and D.C.Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.
10. Dessen,A., C.M.Lawrence, S.Cupo, D.M.Zaller, and D.C.Wiley. 1997. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401)

complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*. 7:473-481.

11. Jardetzky, T.S., J.H. Brown, J.C. Gorga, L.J. Stern, R.G. Urban, Y.I. Chi, C. Stauffacher, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1994. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368:711-718.
12. Smith, K.J., J. Pyrdol, L. Gauthier, D.C. Wiley, and K.W. Wucherpfennig. 1998. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J. Exp. Med.* 188:1511-1520.
13. Hennecke, J., A. Carfi, and D.C. Wiley. 2000. Structure of a covalently stabilized complex of a human alpha beta T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1. *EMBO J.* 19:5611-5624.
14. Ting, J.P. and J. Trowsdale. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-S33.
15. Pieters, J., O. Bakke, and B. Dobberstein. 1993. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell Sci.* 106 (Pt 3):831-846.
16. Doebele, R.C., R. Busch, H.M. Scott, A. Pashine, and E.D. Mellins. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity*. 13:517-527.
17. Nelson, C.A. and D.H. Fremont. 1999. Structural principles of MHC class II antigen presentation. *Rev. Immunogenet.* 1:47-59.
18. Kropshofer, H., A.B. Vogt, C. Thery, E.A. Armandola, B.C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena, and G.J. Hammerling. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* 17:2971-2981.
19. Pieters, J. 2000. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv. Immunol.* 75:159-208.
20. Geuze, H.J. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* 19:282-287.

21. Sanderson, F., M.J.Kleijmeer, A.Kelly, D.Verwoerd, A.Tulp, J.J.Neefjes, H.J.Geuze, and J.Trowsdale. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 266:1566-1569.
22. Germain, R.N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287-299.
23. Germain, R.N. 1995. Binding domain regulation of MHC class II molecule assembly, trafficking, fate, and function. *Semin.Immunol.* 7:361-372.
24. Fabre, J.W. 1991. Regulation of MHC expression. *Immunol.Lett.* 29:3-8.
25. Mach, B., V.Steimle, E.Martinez-Soria, and W.Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu.Rev.Immunol.* 14:301-331.
26. Brusic, V., G.Rudy, G.Honeyman, J.Hammer, and L.Harrison. 1998. Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network. *Bioinformatics.* 14:121-130.
27. Consogno, G., S.Manici, V.Facchinetti, A.Bachi, J.Hammer, B.M.Conti-Fine, C.Rugarli, C.Traversari, and M.P.Protti. 2003. Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3. *Blood* 101:1038-1044.
28. Hammer, J., B.Takacs, and F.Sinigaglia. 1992. Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J.Exp.Med.* 176:1007-1013.
29. Hammer, J., P.Valsasnini, K.Tolba, D.Bolin, J.Higelin, B.Takacs, and F.Sinigaglia. 1993. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 74:197-203.
30. Hammer, J., C.Belunis, D.Bolin, J.Papadopoulos, R.Walsky, J.Higelin, W.Danho, F.Sinigaglia, and Z.A.Nagy. 1994. High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:4456-4460.

31. Hammer, J., E. Bono, F. Gallazzi, C. Belunis, Z. Nagy, and F. Sinigaglia. 1994. Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J. Exp. Med.* 180:2353-2358.
32. Hammer, J. 1995. New methods to predict MHC-binding sequences within protein antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 7:263-269.
33. Sinigaglia, F. and J. Hammer. 1994. Rules for peptide binding to MHC class II molecules. *APMIS* 102:241-248.
34. Sinigaglia, F. and J. Hammer. 1994. Defining rules for the peptide-MHC class II interaction. *Curr. Opin. Immunol.* 6:52-56.
35. Sinigaglia, F. and J. Hammer. 1995. Predicting major histocompatibility complex-binding sequences within protein antigens. *Biochem. Soc. Trans.* 23:675-677.
36. Sinigaglia, F. and J. Hammer. 1995. Motifs and supermotifs for MHC class II binding peptides. *J. Exp. Med.* 181:449-451.
37. Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1994. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* 39:230-242.
38. Rammensee, H. G., T. Friede, and S. Stevanovic. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178-228.
39. Rammensee, H. G. 1995. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7:85-96.
40. Stern, L. J., J. H. Brown, T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
41. Brown, J. H., T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.

42. Posch,P.E., A.E.Hastings, S.Rosen-Bronson, J.R.Richert, and C.K.Hurley. 1996. The relative importance of individual DR binding motif positions as defined by peptide anchor analysis of influenza hemagglutinin peptide 306-318 and human myelin basic protein peptide 152-165 binding to several DR molecules: definition of a common extended DR binding motif. *Eur.J.Immunol.* 26:1884-1891.
43. Demotz,S., C.Barbey, G.Corradin, A.Amoroso, and A.Lanzavecchia. 1993. The set of naturally processed peptides displayed by DR molecules is tuned by polymorphism of residue 86. *Eur.J.Immunol.* 23:425-432.
44. Rotzschke,O., K.Falk, J.Mack, J.M.Lau, G.Jung, and J.L.Strominger. 1999. Conformational variants of class II MHC/peptide complexes induced by N- and C-terminal extensions of minimal peptide epitopes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:7445-7450.
45. Latek,R.R. and E.R.Unanue. 1999. Mechanisms and consequences of peptide selection by the I-Ak class II molecule. *Immunol.Rev.* 172:209-228.
46. Nelson,C.A., I.Vidavsky, N.J.Viner, M.L.Gross, and E.R.Unanue. 1997. Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:628-633.
47. Davis,M.M., J.J.Boniface, Z.Reich, D.Lyons, J.Hampl, B.Arden, and Y.Chien. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 16:523-544.
48. Demotz,S., H.M.Grey, and A.Sette. 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249:1028-1030.
49. Harding,C.V. and E.R.Unanue. 1990. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346:574-576.
50. Cochran,J.R., T.O.Cameron, and L.J.Stern. 2000. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity.* 12:241-250.
51. Boniface,J.J., J.D.Rabinowitz, C.Wulfing, J.Hampl, Z.Reich, J.D.Altman, R.M.Kantor, C.Beeson, H.M.McConnell, and

- M.M.Davis. 1998. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected]. *Immunity*. 9:459-466.
52. Rabinowitz, J.D., C. Beeson, D.S. Lyons, M.M. Davis, and H.M. McConnell. 1996. Kinetic discrimination in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93:1401-1405.
53. McKeithan, T.W. 1995. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92:5042-5046.
54. Kalergis, A.M., N. Boucheron, M.A. Doucey, E. Palmieri, E.C. Goyarts, Z. Vegh, I.F. Luescher, and S.G. Nathenson. 2001. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat. Immunol.* 2:229-234.
55. Baker, B.M., S.J. Gagnon, W.E. Biddison, and D.C. Wiley. 2000. Conversion of a T cell antagonist into an agonist by repairing a defect in the TCR/peptide/MHC interface: implications for TCR signaling. *Immunity*. 13:475-484.
56. Germain, R.N. 1997. T-cell signaling: the importance of receptor clustering. *Curr. Biol.* 7:R640-R644.
57. Viola, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara, and A. Lanzavecchia. 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283:680-682.
58. Viola, A. and A. Lanzavecchia. 1999. T-cell activation and the dynamic world of rafts. *APMIS* 107:615-623.
59. Bromley, S.K., W.R. Burack, K.G. Johnson, K. Somersalo, T.N. Sims, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, and M.L. Dustin. 2001. The immunological synapse. *Annu. Rev. Immunol.* 19:375-396.
60. Grakoui, A., S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, and M.L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221-227.
61. Lee, K.H., A.D. Holdorf, M.L. Dustin, A.C. Chan, P.M. Allen, and A.S. Shaw. 2002. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295:1539-1542.

62. Hamad,A.R., S.M.O'Herrin, M.S.Lebowitz, A.Srikrishnan, J.Bieler, J.Schneck, and D.Pardoll. 1998. Potent T cell activation with dimeric peptide-major histocompatibility complex class II ligand: the role of CD4 coreceptor. *J.Exp.Med.* 188:1633-1640.
63. Veillette,A., M.A.Bookman, E.M.Horak, L.E.Samelson, and J.B.Bolen. 1989. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature* 338:257-259.
64. Konig,R., S.Fleury, and R.N.Germain. 1996. The structural basis of CD4-MHC class II interactions: coreceptor contributions to T cell receptor antigen recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 205:19-46.
65. Wang,J.H., R.Meijers, Y.Xiong, J.H.Liu, T.Sakihama, R.Zhang, A.Joachimiak, and E.L.Reinherz. 2001. Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:10799-10804.
66. Makitalo,B., M.Andersson, I.Arestrom, K.Karlen, F.Villinger, A.Ansari, S.Paulie, R.Thorstensson, and N.Ahlborg. 2002. ELISpot and ELISA analysis of spontaneous, mitogen-induced and antigen-specific cytokine production in cynomolgus and rhesus macaques. *J.Immunol.Methods* 270:85-97.
67. Tarnok,A., J.Hambsch, R.Chen, and R.Varro. 2003. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clin.Chem.* 49:1000-1002.
68. Cook,E.B., J.L.Stahl, L.Lowe, R.Chen, E.Morgan, J.Wilson, R.Varro, A.Chan, F.M.Graziano, and N.P.Barney. 2001. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. *J.Immunol.Methods* 254:109-118.
69. Chen,R., L.Lowe, J.D.Wilson, E.Crowther, K.Tzeggai, J.E.Bishop, and R.Varro. 1999. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin.Chem.* 45:1693-1694.
70. Bennouna,J., A.Hildesheim, K.Chikamatsu, W.Gooding, W.J.Storkus, and T.L.Whiteside. 2002. Application of IL-5 ELISPOT

assays to quantification of antigen-specific T helper responses. *J.Immunol.Methods* 261:145-156.

71. Bailey,T., S.Stark, A.Grant, C.Hartnett, M.Tsang, and A.Kalyuzhny. 2002. A multidonor ELISPOT study of IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IFN-gamma and TNF-alpha release by cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *J.Immunol.Methods* 270:171-182.
72. Kouwenhoven,M., V.Ozenci, N.Teleshova, Y.Hussein, Y.M.Huang, A.Eusebio, and H.Link. 2001. Enzyme-linked immunospot assays provide a sensitive tool for detection of cytokine secretion by monocytes. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 8:1248-1257.
73. Mashishi,T. and C.M.Gray. 2002. The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin.Chem.Lab Med.* 40:903-910.
74. Meierhoff,G., P.A.Ott, P.V.Lehmann, and N.C.Schloot. 2002. Cytokine detection by ELISPOT: relevance for immunological studies in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res.Rev.* 18:367-380.
75. Sander,B., J.Andersson, and U.Andersson. 1991. Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde- saponin procedure. *Immunol.Rev.* 119:65-93.
76. Jung,T., U.Schauer, C.Heusser, C.Neumann, and C.Rieger. 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 159:197-207.
77. O'Neil-Andersen,N.J. and D.A.Lawrence. 2002. Differential modulation of surface and intracellular protein expression by T cells after stimulation in the presence of monensin or brefeldin A. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 9:243-250.
78. Appay,V. and S.L.Rowland-Jones. 2002. The assessment of antigen-specific CD8+ T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining. *J.Immunol.Methods* 268:9-19.
79. Champagne,P., G.S.Ogg, A.S.King, C.Knabenhans, K.Ellefsen, M.Nobile, V.Appay, G.P.Rizzardi, S.Fleury, M.Lipp, R.Forster, S.Rowland-Jones, R.P.Sekaly, A.J.McMichael, and G.Pantaleo. 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410:106-111.

80. Weston,S.A. and C.R.Parish. 1990. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J.Immunol.Methods* 133:87-97.
81. Adkins,B., T.Williamson, P.Guevara, and Y.Bu. 2003. Murine neonatal lymphocytes show rapid early cell cycle entry and cell division. *J.Immunol.* 170:4548-4556.
82. Rimaniol,A.C., G.Garcia, S.J.Till, F.Capel, G.Gras, K.Balabanian, D.Emilie, and M.Humbert. 2003. Evaluation of CD4+ T cells proliferating to grass pollen in seasonal allergic subjects by flow cytometry. *Clin.Exp.Immunol.* 132:76-80.
83. Turner,S.J., R.Cross, W.Xie, and P.C.Doherty. 2001. Concurrent naive and memory CD8(+) T cell responses to an influenza A virus. *J.Immunol.* 167:2753-2758.
84. Champagne,P., G.S.Ogg, A.S.King, C.Knabenhans, K.Ellefsen, M.Nobile, V.Appay, G.P.Rizzardi, S.Fleury, M.Lipp, R.Forster, S.Rowland-Jones, R.P.Sekaly, A.J.McMichael, and G.Pantaleo. 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410:106-111.
85. Voehringer,D., M.Koschella, and H.Pircher. 2002. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectinlike receptor G1 (KLRG1). *Blood* 100:3698-3702.
86. Greten,T.F., J.E.Slansky, R.Kubota, S.S.Soldan, E.M.Jaffee, T.P.Leist, D.M.Pardoll, S.Jacobson, and J.P.Schneck. 1998. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:7568-7573.
87. Le Doussal,J., B.Piqueras, I.Dogan, P.Debre, and G.Gorochov. 2000. Phage display of peptide/major histocompatibility complex. *J.Immunol.Methods* 241:147-158.
88. Prakken,B., M.Wauben, D.Genini, R.Samodal, J.Barnett, A.Mendivil, L.Leoni, and S.Albani. 2000. Artificial antigen-presenting cells as a tool to exploit the immune 'synapse'. *Nat.Med.* 6:1406-1410.

89. Motta, I., Y.C. Lone, and P. Kourilsky. 1998. In vitro induction of naive cytotoxic T lymphocytes with complexes of peptide and recombinant MHC class I molecules coated onto beads: role of TCR/ligand density. *Eur.J.Immunol.* 28:3685-3695.
90. Brophy, S.E., P.D. Holler, and D.M. Kranz. 2003. A yeast display system for engineering functional peptide-MHC complexes. *J.Immunol.Methods* 272:235-246.
91. Hugues, S., L. Malherbe, C. Filippi, and N. Glaichenhaus. 2002. Generation and use of alternative multimers of peptide/MHC complexes. *J.Immunol.Methods* 268:83-92.
92. Burrows, G.G., B.F. Bebo, Jr., K.L. Adlard, A.A. Vandembark, and H. Offner. 1998. Two-domain MHC class II molecules form stable complexes with myelin basic protein 69-89 peptide that detect and inhibit rat encephalitogenic T cells and treat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* 161:5987-5996.
93. Burrows, G.G., K.L. Adlard, B.F. Bebo, Jr., J.W. Chang, K. Tenditnyy, A.A. Vandembark, and H. Offner. 2000. Regulation of encephalitogenic T cells with recombinant TCR ligands. *J.Immunol.* 164:6366-6371.
94. Chang, J.W., D.E. Mechling, H.P. Bachinger, and G.G. Burrows. 2001. Design, engineering, and production of human recombinant T cell receptor ligands derived from human leukocyte antigen DR2. *J.Biol.Chem.* 276:24170-24176.
95. Ge, Q., J.D. Stone, M.T. Thompson, J.R. Cochran, M. Rushe, H.N. Eisen, J. Chen, and L.J. Stern. 2002. Soluble peptide-MHC monomers cause activation of CD8+ T cells through transfer of the peptide to T cell MHC molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:13729-13734.
96. Cochran, J.R. and L.J. Stern. 2000. A diverse set of oligomeric class II MHC-peptide complexes for probing T-cell receptor interactions. *Chem.Biol.* 7:683-696.
97. Xu, X.N., M.A. Purbhoo, N. Chen, J. Mongkolsapaya, J.H. Cox, U.C. Meier, S. Tafuro, P.R. Dunbar, A.K. Sewell, C.S. Hourigan, V. Appay, V. Cerundolo, S.R. Burrows, A.J. McMichael, and G.R. Screaton. 2001. A novel approach to antigen-specific deletion

of CTL with minimal cellular activation using alpha3 domain mutants of MHC class I/peptide complex. *Immunity*. 14:591-602.

98. Dal Porto, J., T.E. Johansen, B. Catipovic, D.J. Parfiit, D. Tuveson, U. Gether, S. Kozlowski, D.T. Fearon, and J.P. Schneck. 1993. A soluble divalent class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90:6671-6675.
99. Mottez, E., P. Langlade-Demoyen, H. Gournier, F. Martinon, J. Maryanski, P. Kourilsky, and J.P. Abastado. 1995. Cells expressing a major histocompatibility complex class I molecule with a single covalently bound peptide are highly immunogenic. *J. Exp. Med.* 181:493-502.
100. Lone, Y.C., I. Motta, E. Mottez, Y. Guilloux, A. Lim, F. Demay, J.P. Levrud, P. Kourilsky, and J.P. Abastado. 1998. In vitro induction of specific cytotoxic T lymphocytes using recombinant single-chain MHC class I/peptide complexes. *J. Immunother.* 21:283-294.
101. Malherbe, L., C. Filippi, V. Julia, G. Foucras, M. Moro, H. Appel, K. Wucherpfennig, J.C. Guery, and N. Glaichenhaus. 2000. Selective activation and expansion of high-affinity CD4+ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity*. 13:771-782.
102. Appel, H., N.P. Seth, L. Gauthier, and K.W. Wucherpfennig. 2001. Anergy induction by dimeric TCR ligands. *J. Immunol.* 166:5279-5285.
103. Arnold, P.Y., K.M. Vignali, T.B. Miller, N.L. La Gruta, L.S. Cauley, L. Haynes, A.P. Scott, S.L. Swain, D.L. Woodland, and D.A. Vignali. 2002. Reliable generation and use of MHC class II:gamma2aFc multimers for the identification of antigen-specific CD4(+) T cells. *J. Immunol. Methods* 271:137-151.
104. Altman, J.D., P.A. Moss, P.J. 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.
105. Cull, M.G. and P.J. Schatz. 2000. Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags. *Methods Enzymol.* 326:430-440.
106. Schatz, P.J. 1993. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus

peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)* 11:1138-1143.

107. Cameron, T.O., P.J. Norris, A. Patel, C. Moulon, E.S. Rosenberg, E.D. Mellins, L.R. Wedderburn, and L.J. Stern. 2002. Labeling antigen-specific CD4(+) T cells with class II MHC oligomers. *J. Immunol. Methods* 268:51-69.
108. 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.
109. Meyer, A.L., C. Trollmo, F. Crawford, P. Marrack, A.C. Steere, B.T. Huber, J. Kappler, and D.A. Hafler. 2000. Direct enumeration of *Borrelia*-reactive CD4 T cells ex vivo by using MHC class II tetramers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:11433-11438.
110. Fremont, D.H., W.A. Hendrickson, P. Marrack, and J. Kappler. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272:1001-1004.
111. Kwok, W.W., A.W. Liu, E.J. Novak, J.A. Gebe, R.A. Ettinger, G.T. Nepom, S.N. Reymond, and D.M. Koelle. 2000. HLA-DQ tetramers identify epitope-specific T cells in peripheral blood of herpes simplex virus type 2-infected individuals: direct detection of immunodominant antigen-responsive cells. *J. Immunol.* 164:4244-4249.
112. Kwok, W.W., N.A. Ptacek, A.W. Liu, and J.H. Buckner. 2002. Use of class II tetramers for identification of CD4+ T cells. *J. Immunol. Methods* 268:71-81.
113. Cameron, T.O., J.R. Cochran, B. Yassine-Diab, R.P. Sekaly, and L.J. Stern. 2001. 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.
114. Blohm, U., E. Roth, K. Brommer, T. Dumrese, F.M. Rosenthal, and H. Pircher. 2002. Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* 169:5522-5530.

115. Luxembourg, A.T., P. Borrow, L. Teyton, A.B. Brunmark, P.A. Peterson, and M.R. Jackson. 1998. Biomagnetic isolation of antigen-specific CD8⁺ T cells usable in immunotherapy. *Nat. Biotechnol.* 16:281-285.
116. Bodinier, M., M.A. Peyrat, C. Tournay, F. Davodeau, F. Romagne, M. Bonneville, and F. Lang. 2000. Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat. Med.* 6:707-710.
117. van Rensen, A.J., M.H. Wauben, M.C. Grosfeld-Stulemeyer, W. van Eden, and D.J. Crommelin. 1999. Liposomes with incorporated MHC class II/peptide complexes as antigen presenting vesicles for specific T cell activation. *Pharm. Res.* 16:198-204.
118. van Rensen, A.J., L.S. Taams, M.C. Grosfeld-Stulemeyer, W. van Eden, D.J. Crommelin, and M.H. Wauben. 2000. Induction of T cell anergy by liposomes with incorporated major histocompatibility complex (MHC) II/peptide complexes. *Pharm. Res.* 17:720-726.
119. Mallet-Designe, V.I., T. Stratmann, D. Homann, F. Carbone, M.B. Oldstone, and L. Teyton. 2003. Detection of Low-Avidity CD4(+) T Cells Using Recombinant Artificial APC: Following the Antiovalbumin Immune Response. *J. Immunol.* 170:123-131.
120. Le Doussal, J., B. Piqueras, I. Dogan, P. Debre, and G. Gorochov. 2000. Phage display of peptide/major histocompatibility complex. *J. Immunol. Methods* 241:147-158.
121. Kurokawa, M.S., S. Ohoka, T. Matsui, T. Sekine, K. Yamamoto, K. Nishioka, and T. Kato. 2002. Expression of MHC class I molecules together with antigenic peptides on filamentous phages. *Immunol. Lett.* 80:163-168.
122. Vest, H.N., P.L. Ostergaard, A. Stryhn, and S. Buus. 2001. Phage display of peptide / major histocompatibility class I complexes. *Eur. J. Immunol.* 31:32-38.
123. Kalandadze, A., M. Galleno, L. Foncerrada, J.L. Strominger, and K.W. Wucherpfennig. 1996. Expression of recombinant HLA-DR2 molecules. Replacement of the hydrophobic transmembrane region by a leucine zipper dimerization motif allows the assembly and secretion of soluble DR alpha beta heterodimers. *J. Biol. Chem.* 271:20156-20162.

124. Starwalt, S.E., E.L. Masteller, J.A. Bluestone, and D.M. Kranz. 2003. Directed evolution of a single-chain class II MHC product by yeast display. *Protein Eng* 16:147-156.
125. Yee, C. and P. Greenberg. 2002. Modulating T-cell immunity to tumours: new strategies for monitoring T-cell responses. *Nat. Rev. Cancer* 2:409-419.
126. Kuroda, M.J., J.E. Schmitz, D.H. Barouch, A. Craiu, T.M. Allen, A. Sette, D.I. Watkins, M.A. Forman, and N.L. Letvin. 1998. Analysis of Gag-specific cytotoxic T lymphocytes in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys by cell staining with a tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complex. *J. Exp. Med.* 187:1373-1381.
127. Nepom, G.T., J.H. Buckner, E.J. Novak, S. Reichstetter, H. Reijonen, J. Gebe, R. Wang, E. Swanson, and W.W. Kwok. 2002. HLA class II tetramers: tools for direct analysis of antigen-specific CD4+ T cells. *Arthritis Rheum.* 46:5-12.
128. Novak, E.J., A.W. Liu, G.T. Nepom, and W.W. Kwok. 1999. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J. Clin. Invest* 104:R63-R67.
129. Kotzin, B.L., M.T. Falta, F. Crawford, E.F. Rosloniec, J. Bill, P. Marrack, and J. Kappler. 2000. Use of soluble peptide-DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:291-296.
130. Novak, E.J., A.W. Liu, J.A. Gebe, B.A. Falk, G.T. Nepom, D.M. Koelle, and W.W. Kwok. 2001. Tetramer-guided epitope mapping: rapid identification and characterization of immunodominant CD4+ T cell epitopes from complex antigens. *J. Immunol.* 166:6665-6670.
131. Greten, T.F., J.E. Slansky, R. Kubota, S.S. Soldan, E.M. Jaffee, T.P. Leist, D.M. Pardoll, S. Jacobson, and J.P. Schneck. 1998. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19-specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95:7568-7573.

132. Boder, E.T. and K.D. Wittrup. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* 15:553-557.
133. Kieckhefer, M.C., E.V. Shusta, E.T. Boder, L. Teyton, K.D. Wittrup, and D.M. Kranz. 1999. Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:5651-5656.
134. Starwalt, S.E., E.L. Masteller, J.A. Bluestone, and D.M. Kranz. 2003. Directed evolution of a single-chain class II MHC product by yeast display. *Protein Eng* 16:147-156.
135. Cameron, T.O., G.B. Cohen, S.A. Islam, and L.J. Stern. 2002. Examination of the highly diverse CD4(+) T-cell repertoire directed against an influenza peptide: a step towards TCR proteomics. *Immunogenetics* 54:611-620.
136. Wedderburn, L.R., S.J. Searle, A.R. Rees, J.R. Lamb, and M.J. Owen. 1995. Mapping T cell recognition: the identification of a T cell receptor residue critical to the specific interaction with an influenza hemagglutinin peptide. *Eur. J. Immunol.* 25:1654-1662.
137. Cunliffe, S.L., J.R. Wyer, J.K. Sutton, M. Lucas, G. Harcourt, P. Klenerman, A.J. McMichael, and A.D. Kelleher. 2002. Optimization of peptide linker length in production of MHC class II/peptide tetrameric complexes increases yield and stability, and allows identification of antigen-specific CD4+ T cells in peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* 32:3366-3375.
138. Kim, S.Y., J.H. Sohn, Y.R. Pyun, and E.S. Choi. 2002. A cell surface display system using novel GPI-anchored proteins in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 19:1153-1163.
139. Matsumoto, T., H. Fukuda, M. Ueda, A. Tanaka, and A. Kondo. 2002. Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4517-4522.
140. Washida, M., S. Takahashi, M. Ueda, and A. Tanaka. 2001. Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:681-686.

141. Holler, P.D., P.O. Holman, E.V. Shusta, S.O'Herrin, K.D. Wittrup, and D.M. Kranz. 2000. In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:5387-5392.
142. Kieke, M.C., E. Sundberg, E.V. Shusta, R.A. Mariuzza, K.D. Wittrup, and D.M. Kranz. 2001. High affinity T cell receptors from yeast display libraries block T cell activation by superantigens. *J. Mol. Biol.* 307:1305-1315.
143. Feldhaus, M.J., R.W. Siegel, L.K. Opresko, J.R. Coleman, J.M. Feldhaus, Y.A. Yeung, J.R. Cochran, P. Heinzelman, D. Colby, J. Swers, C. Graff, H.S. Wiley, and K.D. Wittrup. 2003. Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat. Biotechnol.* 21:163-170.
144. Kieke, M.C., B.K. Cho, E.T. Boder, D.M. Kranz, and K.D. Wittrup. 1997. Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng* 10:1303-1310.
145. Cho, B.K., M.C. Kieke, E.T. Boder, K.D. Wittrup, and D.M. Kranz. 1998. A yeast surface display system for the discovery of ligands that trigger cell activation. *J. Immunol. Methods* 220:179-188.
146. Sakamoto, S., T. Ide, S. Tokiyoshi, J. Nakao, F. Hamada, M. Yamamoto, J.A. Grosby, Y. Ni, and A. Kawai. 1999. Studies on the structures and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogues produced in yeast cells. *Vaccine* 17:205-218.
147. Boder, E.T., K.S. Midelfort, and K.D. Wittrup. 2000. Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:10701-10705.
148. Boder, E.T. and K.D. Wittrup. 2000. Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol.* 328:430-444.
149. Churchill, H.R. and D.M. Kranz. 2003. Directed evolution of T-cell receptors for binding superantigens. *Methods Mol. Biol.* 214:87-99.
150. Sadegh-Nasseri, S. and R.N. Germain. 1991. A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* 353:167-170.

151. Natarajan,S.K., L.J.Stern, and S.Sadegh-Nasser. 1999. Sodium dodecyl sulfate stability of HLA-DR1 complexes correlates with burial of hydrophobic residues in pocket 1. *J.Immunol.* 162:3463-3470.
152. LaPan,K.E., D.G.Klapper, and J.A.Frelinger. 1992. Production and characterization of two new mouse monoclonal antibodies reactive with denatured mouse class II beta chains. *Hybridoma* 11:217-223.
153. Callewaert,D.M., G.Radcliff, R.Waite, J.LeFevre, and M.D.Poulik. 1991. Characterization of effector-target conjugates for cloned human natural killer and human lymphokine activated killer cells by flow cytometry. *Cytometry* 12:666-676.
154. Radcliff,G., R.Waite, J.LeFevre, M.D.Poulik, and D.M.Callewaert. 1991. Quantification of effector/target conjugation involving natural killer (NK) or lymphokine activated killer (LAK) cells by two-color flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 139:281-292.
155. Hubbard,B.B., M.W.Glacken, J.R.Rodgers, and R.R.Rich. 1990. The role of physical forces on cytotoxic T cell-target cell conjugate stability. *J.Immunol.* 144:4129-4138.
156. Shusta,E.V., P.D.Holler, M.C.Kieke, D.M.Kranz, and K.D.Wittrup. 2000. Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nat.Biotechnol.* 18:754-759.
157. Khalaf,A.N., G.Wolff-Vorbeck, K.Bross, L.Kerp, and K.G.Petersen. 1993. In vivo labelling of the spleen with a red-fluorescent cell dye. *J.Immunol.Methods* 165:121-125.
158. Patel,D.M., P.Y.Arnold, G.A.White, J.P.Nardella, and M.D.Mannie. 1999. Class II MHC/peptide complexes are released from APC and are acquired by T cell responders during specific antigen recognition. *J.Immunol.* 163:5201-5210.
159. Deere,D., J.Shen, G.Vesey, P.Bell, P.Bissinger, and D.Veal. 1998. Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. *Yeast* 14:147-160.
160. Boyd,A.R., T.S.Gunasekera, P.V.Attfield, K.Simic, S.F.Vincent, and D.A.Veal. 2003. A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEM.Yeast Res.* 3:11-16.

161. Pina-Vaz,C., F.Sansonetty, A.G.Rodrigues, S.Costa-de-Oliveira, J.Martinez-de-Oliveira, and A.F.Fonseca. 2001. Susceptibility to fluconazole of *Candida* clinical isolates determined by FUN-1 staining with flow cytometry and epifluorescence microscopy. *J.Med.Microbiol.* 50:375-382.
162. Puthalakath,H., A.Strasser, and D.C.Huang. 2001. Rapid selection against truncation mutants in yeast reverse two-hybrid screens. *Biotechniques* 30:984-988.
163. Prein,B., K.Natter, and S.D.Kohlwein. 2000. A novel strategy for constructing N-terminal chromosomal fusions to green fluorescent protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 485:29-34.
164. Shibasaki,S., M.Ueda, T.Iizuka, M.Hirayama, Y.Ikeda, N.Kamasawa, M.Osumi, and A.Tanaka. 2001. Quantitative evaluation of the enhanced green fluorescent protein displayed on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae* by fluorometric and confocal laser scanning microscopic analyses. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 55:471-475.
165. Ye,K., S.Shibasaki, M.Ueda, T.Murai, N.Kamasawa, M.Osumi, K.Shimizu, and A.Tanaka. 2000. Construction of an engineered yeast with glucose-inducible emission of green fluorescence from the cell surface. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 54:90-96.
166. Stubbs,A.C., K.S.Martin, C.Coeshott, S.V.Skaates, D.R.Kuritzkes, D.Bellgrau, A.Franzusoff, R.C.Duke, and C.C.Wilson. 2001. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. *Nat.Med.* 7:625-629.

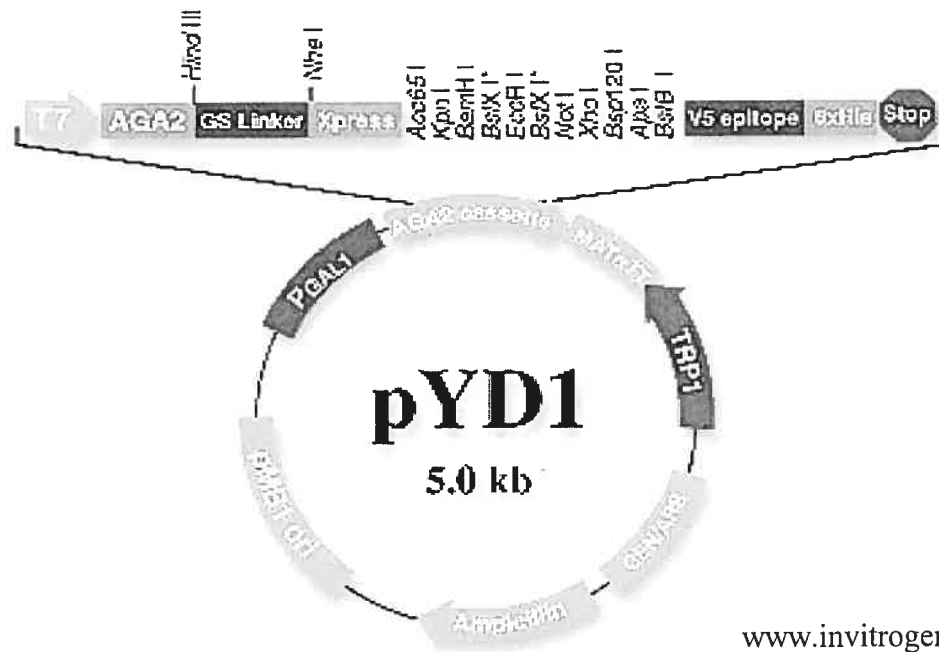
Annexe 1

Haplotype frequencies of HLA loci (XI th Workshop)

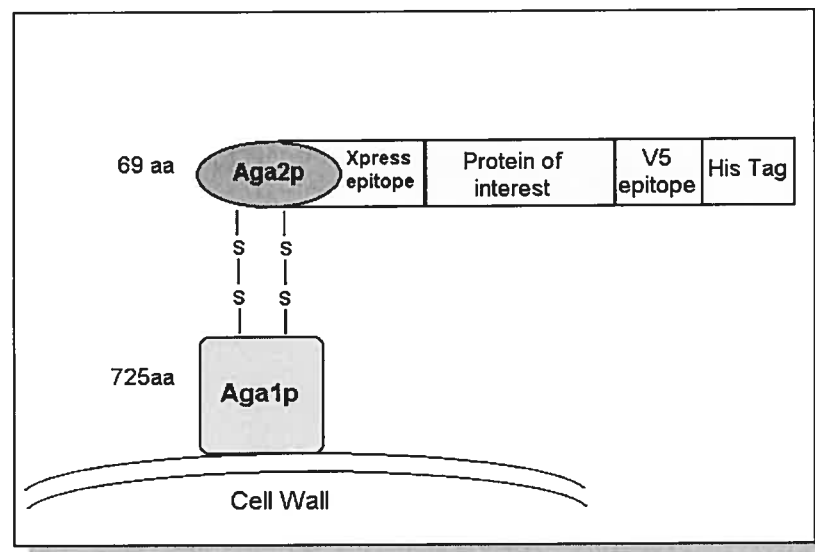
HLA-DR molecule	North American (N = 318)	USA (Whites) (N = 232)	Canadian (N = 146)	French (N = 285)
DR1	6.3*	10.1	12	10.8
DR3	14.7	10.1	11.3	11
DR4	3.4	12.8	18.2	10.8
DR7	9.5	15.1	14.4	13.5
DR8	8.3	3	2.7	5.2
DR9	2.9	1.5	2.1	1.4
DR10	1.1	1.7	0.7	2.5
DR11	13.5	9.7	7.5	9.8
DR12	3.8	1.6	0.7	0.4
DR13	13.8	12.7	11.6	13.2
DR14	2.4	1.5	2.1	3.8
DR15	11.7	10.8	14.4	11.2
DR16	2	1.3	2.1	2.1
Total	30.9	48.8	59	46.3

* HLA-DR molecules cover at last 50-60% of the Caucasian, Oriental, and Afro-American population

Annexe 2



Vecteur d'expression en levure pYD1



Expression en surface de levures de protéines recombinantes en fusion avec le récepteur α -agglutinine.

Annexe 3

Alignement des chaînes α et β de souris (I-A^{g7}) et d'humain (HLA-DRβ1).

Les "M" représente les sites de mutations retrouvés chez les levures reconnues par des anticorps conformationnels après mutagenèse aléatoire. D'après Kranz *et al.* Protein Engineering 2003

```

                                                    β56-57
    M           M       M
HLA-DR1 β chain  FLWQLKFECHFFNGTERVLLERC IYNQEE SVRFDS DVGEYRAVTELGRPDREYWNSQKD
Mouse I-Ag7 β chain FVHQFKGECYFTNGTQRI RLVTRYIYNREEYLRFDS DVGEYRAVTELGRHSAEYYNKQ--
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

    M       M           M       M
HLA-DR1 β chain  ILEDERAAVDTYCRHNYGVGESFTVQRRVE-PKVTVYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPG
Mouse I-Ag7 β chain YLERTRAELDTACRHNYEETEVP TSLRRLEQPNVAISLSRTEALNHHNTLVCSVTDFYPA
** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

    M           M       M       M
HLA-DR1 β chain  SIEVRWFRNGQEEKAGV VSTGLIQNGDWTFFQTLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLT
Mouse I-Ag7 β chain KIKVRWFRNGQEETVGV SSTQLIRNGDWTFFQVLVMLEMTPHQGEVYTCHEHPSLKPIT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

    M
HLA-DR1 β chain  VEWRAR
Mouse I-Ag7 β chain VEWRAQ
* * * * *

    M           M           M           M
HLA-DR1 α chain  YLNP DQSGEFHFD F DGDGEIFHVDMAKKETVWRLEEFGRFASF EAQGALANIAVDKANLEI
Mouse I-Ag7 α chain YQSPGDIGQYTHEFDGD ELFYVDL DKKKT VWRLP EFGQLILFEPQGG LQNI AAEKHNLGI
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

    MM           M           M
HLA-DR1 α chain  MTKRSNYTPITNPPEVIVL TNSPVELREPNVLCIFIDKFT PPVVNVTWLRNGKPVTTGV
Mouse I-Ag7 α chain LTKRSNFTPATNEA PQATVFPKSPVLLGQPNTL ICFVDNIFPPVINITWLRNSKSVTDGV
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

    M           M       M
HLA-DR1 α chain  SETVFLPREDHLFRKFHYLPFLPSTEDVYDCRVEHWGLDEPLLKHWE
Mouse I-Ag7 α chain YETSFLVNRDHSFHKLSYLT FIPSDDD IYDCKVEHWGLEEPVLKHWE
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

<http://us.expasy.org/cgi-bin/sim.pl?prot>
 1F3JA. Chain A, Histocom...[gi:10835694]
 1F3JB. Chain B, Histocom...[gi:10835695]
 P13758. HLA class II hist...[gi:122250]
 P01903. HLA class II hist...[gi:122206]

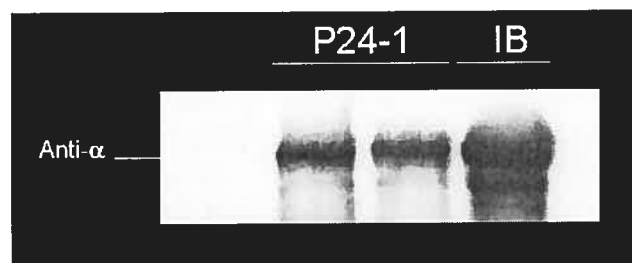


Annexe 4

Production en *E. coli* de molécules recombinantes du CMH de classe II HLA-DR β 0101 exprimant un peptide lié de façon covalente.



Quantification par SDS-PAGE de différentes constructions (Ha et p24-1 de HIV). Après un repliement *in vitro* des protéines, une immunoprécipitation a été effectuée en utilisant des anticorps conformationnels anti-CMH de classe II (L243).



Confirmation par Western Blot de l'identité de la protéine immunoprécipitée par l'anticorps L243 utilisant un anticorps reconnaissant la chaîne α du CMH de classe II

