

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Génération de cellules T régulatrices artificielles**

Par  
Véronique Allard

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.) en virologie et immunologie

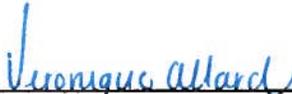
**Jury d'évaluation**

Examineur interne	Alain Lamarre, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Jacques Thibodeau, Université de Montréal
Directeur de recherche	François Denis, INRS-Institut Armand-Frappier

## RÉSUMÉ

Les différences histologiques entre individus compliquent la transplantation d'organes et favorisent le rejet. La prise de médicaments immunosuppresseurs est donc nécessaire mais cause des effets secondaires néfastes. Le traitement idéal consisterait à mimer le potentiel immunosuppresseur des cellules T régulatrices pour contrer le rejet chronique des greffes en étant plus localisé et spécifique. Ce projet avait pour but de générer un système d'expression permettant la sécrétion de cytokines immunosuppressives suite à la reconnaissance des greffons.

Des récepteurs T artificiels ont été créés à partir d'un scFv et des unités de signalisation du CD3  $\zeta$  et du CD28. Dans le modèle expérimental de rejet d'allogreffe utilisé, l'anticorps B8-24-3 duquel est dérivé le scFv reconnaît spécifiquement les CMH-I de souris donneuses. Suite à la reconnaissance de ces ligands, de l'IL-10 cellulaire ou virale et du TGF- $\beta$  seront produits grâce à un vecteur bi-cistronique utilisant le promoteur inducible de l'IL-2. Des essais luciférase ont montré que ce dernier possédait une certaine activité basale suggérant la présence d'un promoteur cryptique dans le vecteur. Pour augmenter l'inductibilité du promoteur de l'IL-2, l'ajout d'un site de polyadénylation devant ce dernier est envisagé en combinaison avec un site de liaison au NFAT trimérisé. Les essais luciférase ont également montré que la co-stimulation via le CD28 augmentait l'activité du promoteur. La chimère avec CD28 devrait donc maximiser l'inductibilité du promoteur. Finalement, un vecteur avec un gène rapporteur telle la luciférase a été construit afin d'ultérieurement suivre les cellules T régulatrices artificielles *in vivo*. Comme le rejet par les cellules NK ne peut être exclu, l'expression de CMH-I non-classiques et de leurs peptides avec un vecteur de la famille SR $\alpha$  pourrait favoriser la survie des cellules modifiées. Tous les outils nécessaires à l'étude ont été générés et certaines expériences *in vitro* restent à être effectuées afin de valider le potentiel des constructions générées qui seront testées dans des modèles *in vivo*.

  
Véronique Allard

  
François Denis

## REMERCIEMENTS

Je tenais à remercier quelques personnes qui ont su, chacune à leur façon, me donner le goût de la science. À mon directeur de recherche, le docteur François Denis, j'aimerais dire que son enseignement fut des plus enrichissant, qu'il a su me transmettre sa passion pour ses idées, et que j'ai apprécié la liberté d'action qu'il me permettait de prendre face à mon projet. Aux autres membres du laboratoire, je dois admettre que sans eux, le bagage avec lequel je ressors aujourd'hui aurait été bien différent. Avoir à refaire le même parcours, je ne le ferais qu'avec eux. Merci Sylvie, Geneviève, Martin et Louis d'avoir répondu à mes nombreuses questions mais aussi de m'avoir fait entrer dans vos propres vies. Vous avez été beaucoup plus que des collègues, mais également des amis précieux.

L'avancement du projet n'aurait pu se faire sans la collaboration des professeurs du centre, particulièrement Claude Daniel. Merci à toi, d'avoir su animer mes journées, d'avoir été une oreille attentive lorsque j'en avais besoin, mais le plus important, d'avoir toujours cru en moi comme tu le fais. Je ne saurais te le dire assez souvent, mais pourtant je le pense sincèrement. Je ne peux également oublier les gens de l'IAF que j'ai appris à connaître durant mon séjour, certains plus intimement, et avec qui j'ai partagé d'agréables moments à veiller quelques fois jusqu'aux petites heures du matin! Surtout toi, Simon, mon complice de toujours. Aucun mot n'arrivera jamais à décrire ces merveilleux souvenirs qui remplissent ma tête. Tout ce que je peux dire c'est que je ne changerais rien à toute l'histoire.

Si j'ai pu réaliser ce projet, c'est entre autres grâce au soutien financier que j'ai eu l'opportunité d'avoir et qui m'a été offert tant par la Fondation Armand-Frappier, l'INRS, le FRSQ que le Dr Denis.

Je tenais spécialement à conclure ces remerciements en exprimant toute la gratitude que j'éprouve pour ma famille ou les membres qui s'y rattachent. À Michele, celui qui partage ma vie, je lui suis gré d'avoir dû, à certaines reprises, me supporter et de s'être toujours intéressé à ce que je faisais. Ta curiosité et ton intelligence me sont exemplaires.

À mes parents aussi, dont je suis l'heureux mélange. C'est toi papa, le premier, qui m'a transmis la fascination que tu avais pour les sciences. C'est en me parlant de biologie, en découpant certains articles dans les journaux, en essayant de toujours trouver des explications scientifiques à ce que je pouvais dénicher comme nouveau phénomène que je suis aujourd'hui devenue qui je suis. Et toi maman qui m'a transmis ta sensibilité mais aussi ta persévérance. Je ne peux suivre que ton exemple pour aller au bout de moi-même. J'aimerais finalement te dire un merci particulier (un merci peut-être indirect à grand-maman aussi...) pour m'avoir inculqué la notion que l'éducation est le plus bel héritage que tu puisses jamais me donner. Car c'est à toi que je songerai, le jour où je le dirai à mon tour...

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
INTRODUCTION .....	1
1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
1.1. Les cellules T régulatrices (Tregs) .....	3
1.1.1. Les cellules Tregs naturelles .....	3
1.1.1.1. Les cellules CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> .....	4
1.1.1.2. Les cellules NKT .....	6
1.1.2. Les cellules Tregs induites .....	7
1.1.2.1. Les cellules Tr1 .....	7
1.1.2.2. Les cellules Th3 .....	7
1.1.2.3. Les cellules CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> .....	8
1.2. Tolérance Infectieuse .....	9
1.2.1. Implication des Tregs dans la tolérance infectieuse.....	10
1.2.2. Mécanisme de la tolérance infectieuse.....	11
1.3. Récepteur de cellule T.....	12
1.3.1. Récepteur T artificiel.....	13
1.3.1.1. Reconnaissance par les récepteurs T artificiels .....	14
1.3.1.2. Signalisation intracellulaire .....	14
1.3.2. Ligand du récepteur T artificiel.....	16
1.4. Vecteurs multicistroniques.....	17
1.4.1. Site d'entrée interne aux ribosomes.....	17
1.4.2. Promoteur inductible .....	18
1.4.2.1. Le promoteur de l'IL-2 .....	18
1.4.3. Cytokines immunosuppressives .....	19
1.4.3.1. L'interleukine-10.....	20
1.4.3.2. Le TGF-β .....	21
2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	24
2.1. Souches bactériennes utilisées.....	24
2.2. Tampons et milieux utilisés.....	24
2.3. Oligonucléotides utilisés.....	25
2.4. Vecteurs utilisés.....	26

2.4.1. pDisplay.....	26
2.4.2. pBluescript II SK+.....	27
2.4.3. SR $\alpha$ puroMCS1 .....	27
2.4.4. pCR4Blunt-TOPO .....	28
2.5. Clonage d'acides nucléique.....	28
2.5.1. Extraction d'ADN génomique .....	28
2.5.2. Extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol.....	29
2.5.3. Extraction d'ARN et synthèse d'ADN complémentaire .....	29
2.5.4. Réaction de polymérase en chaîne (PCR) et mutagenèse dirigée .....	30
2.5.5. Manipulation d'extrémités d'ADN.....	30
2.5.5.1. Génération d'extrémités franches.....	30
2.5.5.2. Déphosphorylation.....	31
2.5.6. Digestion et ligation .....	31
2.5.7. Purification d'ADN sur gel .....	32
2.5.8. Transformation bactérienne.....	33
2.5.9. Criblage de clones recombinants.....	33
2.5.10. Préparation d'ADN à grande échelle.....	34
2.5.11. Séquençage.....	35
2.6. Culture cellulaire .....	35
2.6.1. Lignées cellulaires.....	35
2.6.2. Isolation de PBMC .....	35
2.6.3. Transfections transitoires .....	36
2.6.4. Transfections stables .....	36
2.6.5. Analyse par cytométrie en flux.....	37
2.6.6. Microscopie à fluorescence .....	38
2.6.7. Stimulation cellulaire.....	38
2.6.8. Suivi cellulaire après injection <i>in vivo</i> .....	38
2.7. Analyse protéique.....	39
2.7.1. Essais luciférase.....	39
2.7.2. Test ELISA .....	39
3. RÉSULTATS.....	41
3.1. Construction de vecteurs SR $\alpha$ .....	41
3.1.1. Fonctionnalité du promoteur SR $\alpha$ .....	41
3.2. Construction de vecteurs multi-cistronique.....	42
3.2.1. Validation du vecteur tri-cistronique.....	43
3.3. Clonage d'un promoteur inductible .....	46
3.3.1. Inductibilité du promoteur .....	46
3.3.2. Expression contrôlée .....	47
3.4. Assemblage des récepteurs T artificiels .....	48
3.4.1. Spécificité des anticorps.....	50
3.4.2. Unité de reconnaissance antigénique .....	52
3.4.3. Expression des récepteurs T artificiels.....	53

3.5. Clonage des cytokines immunosuppressives.....	54
3.5.1. ADNc de l'IL-10c/IL-10v.....	54
3.5.2. ADNc du TGF- $\beta$ .....	55
3.6. Transfections stables et étude <i>in vivo</i> .....	56
3.6.1. Optimisation des transfections stables.....	57
4. DISCUSSION.....	59
4.1. Construction du vecteur pSR $\alpha$ blastLuc.....	59
4.2. Production d'un vecteur bicistronique inductible.....	59
4.3. Production de récepteurs T artificiels.....	61
4.4. Fonctionnalité des récepteurs.....	62
4.5. Détection de cytokines immunosuppressives.....	63
4.6. Activité NK.....	64
5. CONCLUSION.....	66
6. ANNEXE I.....	68
6.1. Article #1 : A family of vectors with different selection markers for the co-expression of several proteins in eucaryotic cells.....	68
6.1.1. Résumé français de l'article #1.....	68
6.1.2. Article #1 complet.....	68
7. BIBLIOGRAPHIE.....	83

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Suppression des réponses allogéniques par les cellules CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> .....	9
Figure 2. Tolérance « infectieuse » induite suite à une allogreffe de peau.....	10
Figure 3. Mécanisme d'action des cellules CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> .....	11
Figure 4. Similitudes entre les IgG, RcT et leurs dérivés. ....	13
Figure 5. Éléments de régulation présents sur promoteur d'IL-2. ....	19
Figure 6. Représentation du complexe latent du TGF-β1.....	22
Figure 7. Représentation du vecteur pDisplay.....	26
Figure 8. Représentation du vecteur pBluescriptII SK+.....	27
Figure 9. Représentation du vecteur SRαpuroMCS1. ....	27
Figure 10. Représentation du vecteur pCR4Blunt-TOPO. ....	28
Figure 11. Expression de la luciférase avec le vecteur rapporteur SRblastLuc.....	42
Figure 12. Analyse au FACS de hrGFP dans chacun des cistrons .....	43
Figure 13. Analyse par FACS de co-expression de hrGFP et DsRed2.....	44
Figure 14. Analyse par microscopie à fluorescence de co-expression de hrGFP et DsRed2.....	45
Figure 15. Construction de vecteurs possédant le promoteur inducible de l'IL-2. ....	46
Figure 16. Expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur de l'IL-2.....	47
Figure 17. Expression contrôlée de la luciférase par les cellules BW5147.3. ....	48
Figure 18. Assemblage des unités de signalisation dans pDisplay.....	50
Figure 19. Comparaison de la spécificité des anticorps B8-24-3 et K204 par FACS .....	51
Figure 20. Assemblage des récepteurs T artificiels dans pDisplay .....	53
Figure 21. Analyse par RT-PCR de l'expression des récepteurs T artificiels dans les cellules BW5147.3.....	54
Figure 22. Construction d'un analogue de l'IL-10c. ....	55
Figure 23. Génération d'un vecteur bi-cistronique pour l'expression de cytokines.....	56
Figure 24. Fluorescence des cellules BW5147.3 transfectées avec la hrGFP .....	57

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Géotypes des souches bactériennes utilisées .....	24
Tableau II. Tampons utilisés pour la manipulation d'acides nucléiques .....	24
Tableau III. Autres tampons et milieux utilisés .....	25
Tableau IV. Séquence des amorces utilisées .....	25
Tableau V. Analyse par FACS de l'expression stable de la hrGFP par les cellules BW5147.3 transfectées au nucleofector <sup>TM</sup> .....	58

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>AcMo</b>	Anticorps monoclonaux
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BSA</b>	Albumine sérique bovine
<b>CD</b>	Marqueur de différenciation
<b>CDR</b>	Région hypervariable
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigènes
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic lymphocyte-associated antigen 4
<b>DC</b>	Cellule dendritique
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>dNTPs</b>	Désoxyribonucléotides triphosphates
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EDTA</b>	Acide éthylène-diaminetétraacétique
<b>eIF</b>	Facteur d'initiation eucaryotique
<b>GITR</b>	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
<b>hrGFP</b>	Protéine humanisée verte fluorescente
<b>HEPES</b>	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine éthanesulfonique
<b>IL-10c</b>	Interleukine-10 cellulaire
<b>IL-10v</b>	Interleukine-10 virale
<b>IRES</b>	Séquence d'entrée interne au ribosome
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LAP</b>	Latency associated protein
<b>LB</b>	Luria broth
<b>LTBP</b>	Protéine se liant au TGF- $\beta$ 1 latent

<b>MCS</b>	Site de clonage multiple
<b>pb</b>	Paire de bases
<b>PBMC</b>	Cellules sanguines périphériques mononucléées
<b>PBS</b>	Tampon phosphate salin
<b>PCR</b>	Réaction de polymérase en chaîne
<b>PEI</b>	Polyéthylèneimine
<b>pmol</b>	Picomole
<b>PSG</b>	pénicilline, streptomycine et glutamine
<b>RcT</b>	Récepteur de cellule T
<b>RT</b>	Transcriptase inverse
<b>scFv</b>	Simple chaîne de fragments variables
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>TAE</b>	Tampon tris-acétate-EDTA
<b>TBE</b>	Tampon tris-borate-EDTA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor
<b>TGF-<math>\beta</math>a</b>	TGF- $\beta$ activé
<b>Treg</b>	Cellule T régulatrice
<b>UTR</b>	Région non traduite
<b>UV</b>	Rayons ultraviolets

## INTRODUCTION

La médecine moderne a permis l'élaboration de soins plus spécifiques pour le contrôle de certaines maladies. Les greffes d'organes en sont de bons exemples, quoique l'incompatibilité tissulaire (histocompatibilité) entre individus constitue une barrière à la transplantation. Bien que le Québec présente le plus haut taux de donneurs parmi les provinces canadiennes, le temps d'attente pour un receveur est très long et varie de quelques mois à plus de deux ans et demi. Au premier janvier 2004, 860 patients se trouvaient sur une liste d'attente pour une greffe alors que seulement 488 transplantations ont été réalisées dans l'année, reportant le nombre de personnes inscrites sur les années à venir (*Statistiques québécoises sur le don d'organes 2003, Québec-Transplant*). Malgré une similarité histologique entre donneur et receveur, l'organe greffé possède des molécules étrangères au receveur ce qui favorise le rejet. La prise d'immunosuppresseurs comme la cyclosporine A permet la survie des greffons sans pour autant empêcher le rejet chronique. L'utilisation continue de médicaments est nécessaire mais l'immunosuppression généralisée qu'elle cause rend le patient susceptible aux infections. Une thérapie plus spécifique s'avérerait un traitement supérieur.

Il existe un type cellulaire, les cellules T régulatrices (Treg), capables de sécréter de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , deux cytokines ayant des propriétés immunosuppressives naturelles qui pourraient être utilisées en immunothérapie. Non seulement ces cytokines permettent le contrôle de l'activité des lymphocytes T effecteurs, elles induisent également un état de tolérance. Nombreuses sont les preuves de l'implication des cellules T régulatrices dans la tolérance périphérique. La capacité de polariser les cellules effectrices vers un phénotype régulateur pourrait être utilisée dans le cadre d'une thérapie visant à contrer le rejet de greffe. Les cellules effectrices, présentes au greffon et responsables du rejet, auraient une activité lytique ou inflammatoire réduite et pourraient devenir des Tregs qui produisent de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ . Cette immunosuppression serait localisée sans affecter l'ensemble du système immunitaire du patient.

Ce travail visait à générer un système permettant l'expression régulée d'IL-10 et de TGF- $\beta$  suite à la reconnaissance spécifique de molécules du greffon. Pour ce faire, des

récepteurs T artificiels qui combinent les propriétés de reconnaissance indépendante du CMH et de signalisation ont été construits. Ces récepteurs chimériques sont formés d'anticorps simple-chaîne (scFv) spécifiques aux CMH-I de souris donneuses utilisées dans un modèle de rejet de greffe murin, unis au complexe de signalisation du récepteur T, le CD3 zeta. Comme la molécule CD28 fournit un signal de co-stimulation pour l'activation maximale de la cellule, des chimères contenant les éléments de signalisation du CD28 ont été générées. Dans le modèle expérimental de rejet utilisé, les souris donneuses expriment les CMH-I H-2D<sup>b</sup>, D<sup>p</sup>, K<sup>b</sup> et K<sup>p</sup> et les souris receveuses K<sup>k</sup> et D<sup>k</sup>. Des récepteurs artificiels reconnaissant spécifiquement les haplotypes b et p ont été choisis pour poursuivre les études *in vivo*. Après activation cellulaire, la production concomitante d'IL-10 et de TGF- $\beta$  sera possible grâce à un vecteur multi-cistronique. Ce dernier, sous contrôle du promoteur inducible de l'IL-2, assure que l'expression des cytokines n'ait lieu qu'après la reconnaissance du ligand par le récepteur T artificiel.

## 1. REVUE DE LITTÉRATURE

### 1.1. Les cellules T régulatrices (Tregs)

Peu après la découverte à la fin des années soixante que les cellules T agissaient comme auxiliaires dans l'activation des cellules B, R.K. Gershon émit l'hypothèse que les lymphocytes T pourraient agir dans le sens opposé et supprimer les réponses immunitaires [1, 2]. L'identification de ces cellules « suppressives » étant difficile par l'absence de marqueurs spécifiques et distincts des autres populations cellulaires, l'intérêt qui leur était porté diminua peu à peu. Ce n'est que récemment que l'importance des cellules régulatrices dans le contrôle des réponses immunitaires fut mise en lumière et elles font depuis l'objet d'intenses recherches. Plusieurs modèles décrits renforcent leur rôle dans le contrôle des maladies auto-immunes comme les gastrites, les thyroïdites, le diabète de type I et les maladies inflammatoires de l'intestin qui regroupent la maladie de Crohn et les colites ulcéreuses [3, 4]. D'autres travaux leur suggèrent un rôle dans le contrôle des allergies [5], de certaines maladies infectieuses [6], et une implication dans la tolérance périphérique [7, 8]. Cette population hétérogène de cellules est nommée cellules T régulatrice (Tregs) et les Tregs naturelles se distinguent des Tregs induites selon le profil de cytokines qu'elles produisent et leurs mécanismes d'action.

#### 1.1.1. Les cellules Tregs naturelles

Le système immunitaire se doit de distinguer les antigènes du soi de ceux du non-soi. Les antigènes étrangers reconnus initient une réponse inflammatoire alors que les antigènes du soi ne devraient susciter aucune réponse. C'est lors d'une activation cellulaire suite à la reconnaissance d'auto-antigènes que des pathologies associées à des troubles immunitaires se déclenchent. Dans le thymus, la tolérance centrale implique l'élimination de cellules T auto-réactives alors qu'en périphérie, la mort cellulaire, l'anergie et l'activation de cellules Tregs permettent de maintenir la tolérance [9]. Il existe deux types bien définis de Tregs naturellement présentes; les cellules  $CD4^+CD25^+$  et les cellules NKT.

#### 1.1.1.1. Les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Caractérisées par S. Sakaguchi, les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> représentent environ 5 à 10 % des cellules T CD4<sup>+</sup> présentes en périphérie [10, 11] et expriment de façon constitutive la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 (IL-2R), le CD25 [2, 4, 12]. Les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont de puissants suppresseurs de l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> [11, 13]. À l'opposé d'autres Tregs qui produisent des cytokines inhibitrices comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , la suppression induite par les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> requiert un contact direct avec les cellules effectrices après activation via leur récepteur de cellules T (RcT) [13, 14, 15]. La capacité des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> d'induire une suppression par contact cellulaire a été démontrée avec des anticorps anti-IL-10 ou anti-TGF- $\beta$  neutralisants [16, 17]. Il s'avère que cette population de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> n'est pas homogène et contient des cellules ayant des niveaux variables de marqueurs de Tregs. L'expression élevée du CD25 seul ne suffit pas à conférer des propriétés suppressives aux Tregs [11, 18]. Les « vraies » CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressives produisent du TGF- $\beta$ , mais pas d'IL-10, d'IFN- $\gamma$ , d'IL-4 ou d'IL-2 [19]. Outre ce profil de sécrétion particulier, les Tregs naturelles peuvent être reconnues par l'expression de CD45RB<sup>bas</sup>, CTLA-4, GITR et Foxp3. CD45RB est un marqueur d'activation et permet de suivre les différents stades de développement des cellules CD4<sup>+</sup>. L'expression de ce marqueur diminue lorsqu'une cellule naïve est activée [20]. Il existe une catégorie de cellules CD4<sup>+</sup> n'exprimant pas CD25, mais exprimant le CD45RB<sup>bas</sup>. Étonnamment, ces cellules peuvent induire la tolérance et renverser certaines maladies auto-immunes [21, 22]. L'expression réduite de ce marqueur pourrait donc avoir un lien avec le potentiel suppresseur de ces cellules.

Bien que l'expression constitutive de CTLA-4 soit restreinte aux cellules CD4<sup>+</sup> et aux Tregs, une corrélation entre l'acquisition de ce marqueur et les fonctions suppressives n'a pas été clairement démontrée. CTLA-4 pourrait contribuer à la suppression grâce à ses propriétés de signalisation [23]. Cette molécule inhibe l'activation des cellules T soit en induisant un signal négatif coïncidant avec la stimulation par le RcT ou encore en inhibant la co-stimulation par compétition avec CD28 pour la liaison à ses ligands B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86) [24]. Le blocage de CD28 pourrait être utile en thérapie des maladies autoimmunes, mais d'un autre côté, il a aussi été démontré que le blocage de

cette voie pouvait aggraver certaines maladies, dont le diabète auto-immun. Chez les souris CD28 ou B7-1/B7-2 déficientes, le nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> décroît dramatiquement [25]. Cette voie de co-stimulation semble donc indispensable à l'homéostasie des cellules T régulatrices.

Au contraire de CTLA-4, la présence de GITR semble freiner le pouvoir de suppression des Tregs [26]. En effet, l'interaction entre GITR et son ligand naturel (GITR-L) ou des anticorps anti-GITR bloque la suppression des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et mène au développement de maladies auto-immunes [27, 28]. D'un autre côté, l'expression du GITR tant chez les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> activées empêche le développement de colites ulcéreuses [29]. Quoique le mécanisme de régulation de l'expression du GITR-L par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) soit peu connu, les interactions GITR/GITR-L ou l'expression seule de ce marqueur semblent jouer un rôle dans le potentiel régulateur des cellules CD4<sup>+</sup>.

Plus récemment, une analyse génétique a permis d'identifier le gène défectueux chez les patients ou souris souffrant de désordres immuns liés au chromosome X. Le gène *Foxp3*, ou *Scurfin*, est un facteur de transcription découvert chez les souris « *scurfy* ». Il a été démontré que *Foxp3* jouait un rôle central dans le développement des cellules Tregs puisque l'expression de ce gène est spécifique aux cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup> et que son transfert dans des cellules T naïves permettait de changer le phénotype de cellules effectrices en cellules régulatrices [30].

Afin de maintenir la tolérance périphérique, les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reçoivent une stimulation constante par les antigènes du soi [4] et leur passage d'un état anergique à activé dépend de la présence d'IL-2 ou d'IL-4 dans leur micro-environnement [16]. Leur activation permet la sécrétion de TGF- $\beta$  qui agit en synergie avec l'IL-2 sur les cellules T naïves en inhibant leur apoptose et en altérant leur fonctions effectrices [31]. Le TGF- $\beta$  contribue à l'augmentation de l'expression de CD4, CD25, CTLA-4 [32] et favorise la prolifération du faible nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> présentes en périphérie. Comme les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expriment de manière constitutive le récepteur de type II du

TGF- $\beta$  (T $\beta$ RII), des interactions autocrines ou paracrines peuvent aussi mener à l'activation de la population CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [10]. À grande concentration, un des effets du TGF- $\beta$  est cependant d'inhiber la production d'IL-2 ce qui peut aussi contrôler les activités des cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> environnantes [15].

#### 1.1.1.2. Les cellules NKT

Les cellules NKT expriment des marqueurs de cellules NK et de cellules T comme NK1.1 et le RcT. Ces cellules peuvent être CD4<sup>+</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> et possèdent un récepteur T codé par les gènes V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 8 chez la souris et V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11 chez l'humain [33]. Le ligand reconnu par ce RcT est le glycolipide  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) présenté par une molécule apparentée au CMH de classe I, le CD1d [34]. Les cellules NKT sont différentes des cellules NK conventionnelles mais ont conservé un pouvoir cytotoxique via l'expression de perforine, granzyme B et FasL ce qui leur confère une activité anti-tumorale [35], contrairement aux cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> qui peuvent induire un privilège immunitaire aux cellules cancéreuses [36]. Elles seraient aussi capables de régulation puisqu'elles contrôlent certaines pathologies associées aux cellules T. Le diabète de type I est une maladie auto-immune menant à la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas et fournit un modèle expérimental pour étudier la régulation par les cellules NKT. Il a entre autres été démontré que leur nombre ainsi que leurs fonctions étaient altérées dans le modèle murin NOD [37]. Alors que ces cellules produisent habituellement beaucoup d'IFN- $\gamma$ , d'IL-4 et d'IL-10, les niveaux de ces cytokines sont moins élevés chez les individus souffrant de diabète auto-immun [38]. Bien que contestés [33], des résultats similaires ont été observés dans le lupus érythémateux systémique [39], l'arthrite rhumatoïde [40, 41] et la sclérose en plaques [42]. L'administration du ligand reconnu par les cellules NKT peut également renverser la condition diabétique de sujets [37, 38, 43, 44, 45] et contribuer au contrôle du développement de colites [46]. Ces observations suggèrent que les cellules NKT pourraient jouer un rôle dans la suppression de l'auto-immunité.

### 1.1.2. Les cellules Tregs induites

La tolérance aux antigènes du soi peut dépendre d'autres types de cellules régulatrices que celles naturellement présentes dans l'organisme. Sous l'exposition répétée d'antigènes, l'induction de nouvelles cellules Tregs, tant *in vitro* qu'*in vivo*, peut avoir lieu et parmi celles-ci se retrouvent les Tr1, Th3 et les cellules CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>.

#### 1.1.2.1. Les cellules Tr1

L'activation de cellules CD4<sup>+</sup> en présence d'IL-10 a mené à la découverte de cette classe de cellules Tregs qui peuvent empêcher le développement de maladies inflammatoires de l'intestin et qui présentent un profil de production de cytokines différent des cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> conventionnelles [47]. Les cellules Tr1 produisent beaucoup d'IL-10 et de TGF-β, un taux modéré d'IFN-γ et d'IL-5, peu d'IL-2 et pas d'IL-4 [48]. C'est par la production de deux cytokines modulatrices (l'IL-10 et le TGF-β) que ces cellules arrivent à supprimer directement les réponses effectrices ou à agir indirectement en diminuant l'expression de molécules de co-stimulation sur les CPA [9]. Outre leur profil de sécrétion de cytokines particulier, les cellules Tr1 diffèrent des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> parce que leur action ne dépend pas de contacts cellulaires. Quoique l'IL-10 semble importante tant pour les fonctions effectrices que pour la différenciation de ces cellules, la présence d'IFN-γ et la stimulation via le RcT mène à une prolifération plus forte [49]. *In vitro*, l'utilisation d'IL-15 s'est avérée utile pour permettre l'expansion des cellules Tr1 indépendamment d'une stimulation via le RcT suggérant que l'IL-15 jouerait un rôle dans la survie à long terme des Tr1 *in vivo*. La production de TGF-β semble, pour sa part, dépendre de la voie de signalisation passant par CTLA-4 dont l'expression augmente après activation des Tr1 puisque l'utilisation d'anticorps anti-CTLA-4 empêche la sécrétion [48].

#### 1.1.2.2. Les cellules Th3

Une autre sous-classe de cellules CD4<sup>+</sup> identifiée qui exerce des fonctions de régulation sont les cellules Th3 découvertes suite aux études menées sur la tolérance orale. Ces cellules ont été induites chez des patients atteints de sclérose en plaques après

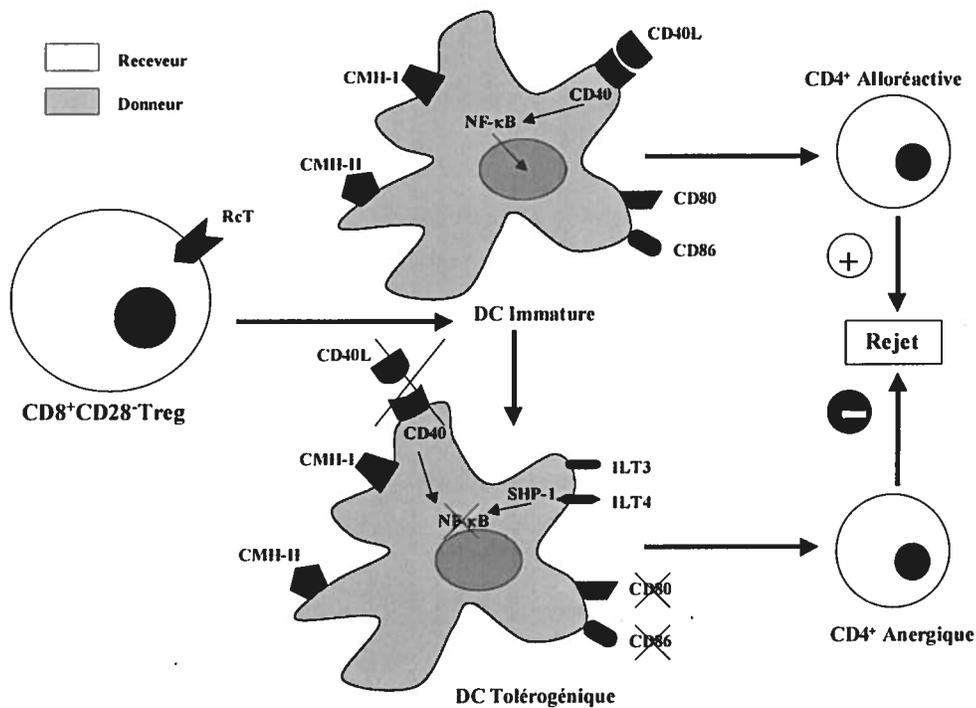
un traitement oral avec de faibles doses de la protéine basique de la myéline et de la protéine protéolipidique [50]. L'importance de la dose utilisée a été démontré dans l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) qui est un modèle murin de sclérose en plaques. Alors que de fortes doses induisent une anergie ou la mort cellulaire, de faibles doses de myéline mènent à la génération de cellules régulatrices productrices de cytokines qui dépendent du TGF- $\beta$  pour exercer leurs fonctions [51]. Le transfert adoptif de ces clones régulateurs dans le modèle EAE permet ainsi de bloquer la maladie [52]. Les Th3 produisent beaucoup de TGF- $\beta$  et des quantités variables d'IL-10 et d'IL-4 [53]. Leur prolifération en culture dépend de la présence de ces trois mêmes cytokines et de l'IL-12 [53].

#### 1.1.2.3. Les cellules CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>

Bien que la majorité des Tregs soient CD4<sup>+</sup>, il existe une sous-classe de cellules CD8<sup>+</sup> ayant des fonctions suppressives. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> contiennent des précurseurs de cellules T cytotoxiques (Tc) et de cellules T suppressives [9]. Contrairement aux Tregs CD4<sup>+</sup> qui induisent l'inactivation de cellules effectrices directement par contact cellulaire ou par sécrétion de cytokines, les cellules CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> procèdent via un intermédiaire, une CPA, qui relie indirectement la CD8<sup>+</sup> suppressive à la CD4<sup>+</sup> effectrice [54, 55]. Cette suppression ne se produit donc que si la CPA possède un CMH de classe I pour interagir avec la cellule CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> et un CMH de classe II pour interagir avec la cellule CD4<sup>+</sup> effectrice [56]. Le contact entre la cellule suppressive et la CPA est d'une grande importance comme en témoignent les études réalisées avec les surnageants de cultures tri-cellulaires. Contrairement à l'utilisation d'anticorps anti-IL-4, anti-IL-10, anti-TGF- $\beta$  et anti-CTLA-4 neutralisants, l'utilisation de chambres cellulaires permettant uniquement la diffusion du milieu de culture empêche toute suppression des cellules CD4<sup>+</sup> effectrices, démontrant que cette suppression indirecte dépend d'un contact cellulaire plutôt que de la production de cytokines [57].

Cette suppression résulterait d'un blocage de la voie de signalisation CD40/CD40 ligand (CD40L) suite à l'exposition de cellules dendritiques (DC) immatures avec des cellules CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> [58]. Cette voie de signalisation induit l'activation du facteur

nucléaire de transcription NF- $\kappa$ B qui mène à la maturation de la cellule dendritique et une expression élevée des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 à la surface. En bloquant le CD40, non seulement ces molécules de co-stimulation ne sont plus exprimées, mais l'expression de récepteurs inhibiteurs comme ILT3 (Immunoglobulin-like transcript) et ILT4 est augmentée. Ces récepteurs, exprimés par les monocytes et les DC, sont structurellement et fonctionnellement apparentés aux récepteurs inhibiteurs KIR des cellules NK. Ils permettent l'inhibition de la maturation cellulaire via le recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-1 qui affecterait l'activation du NF- $\kappa$ B [59]. Dans un modèle d'alloréactivité en présence d'alloantigènes, les cellules CD4<sup>+</sup> deviennent anergiques en absence de co-stimulation par la CPA (Figure 1) [54]. Ces CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> suppriment de façon indirecte la capacité des CD4<sup>+</sup> à proliférer en inhibant la production d'IL-2, en diminuant l'expression du CD40L et en augmentant l'expression de CD25 [57, 59].



**Figure 1. Suppression des réponses allogéniques par les cellules CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>.**

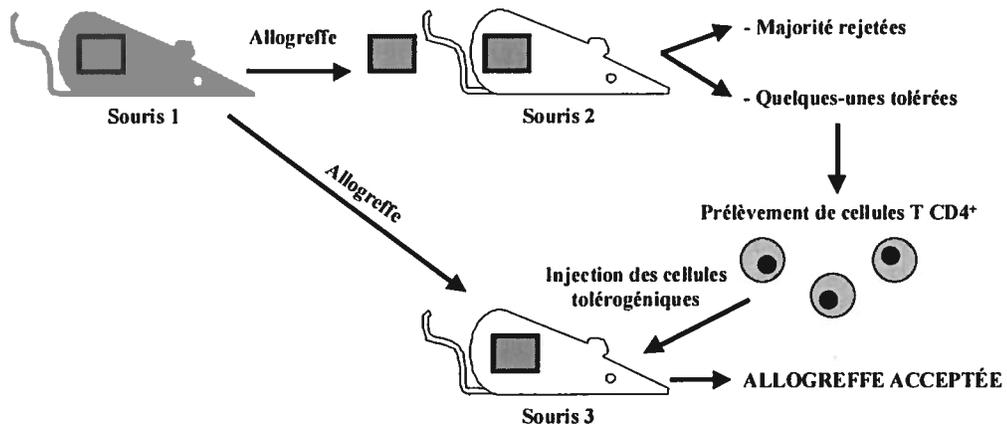
## 1.2. Tolérance infectieuse

La tolérance infectieuse est un processus par lequel les Tregs polarisent d'autres cellules T à devenir elles-mêmes régulatrices. Ce phénomène a d'abord été décrit à la

suite d'expériences utilisant des anticorps monoclonaux (AcMo) dirigés contre CD4 ou CD8. L'utilisation d'AcMo chez des souris ayant subi une transplantation de peau permet de bloquer l'activité des cellules effectrices. C'est S. Qin qui démontra que non seulement cette thérapie aux anticorps induisait une survie à long terme de la greffe [60, 61], mais aussi que le transfert adoptif des cellules T de souris tolérantes à une souris naïve induisait une tolérance similaire [62]. Ce n'est que plus tard que la même équipe démontra l'importance des cellules Tregs CD4<sup>+</sup> dans le maintien de la tolérance [8, 63].

### 1.2.1. Implication des Tregs dans la tolérance infectieuse

Plusieurs exemples prouvent que la tolérance aux greffons serait causée par des cellules Tregs naturellement présentes en périphérie [7]. Davies *et al.* ont démontré que les cellules CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>bas</sup> empêchaient le rejet aiguë des îlots du pancréas [64], alors que Wood et ses collègues ont pu favoriser la survie d'une greffe de peau après l'injection de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Dans cette dernière expérience, les cellules générées lors d'une première greffe permettaient le développement d'une tolérance spécifique envers les antigènes exprimés par le greffon. Le transfert subséquent de Tregs à une tierce souris possédant les mêmes antigènes protégeait alors du rejet d'allogreffe (Figure 2) [21, 65].



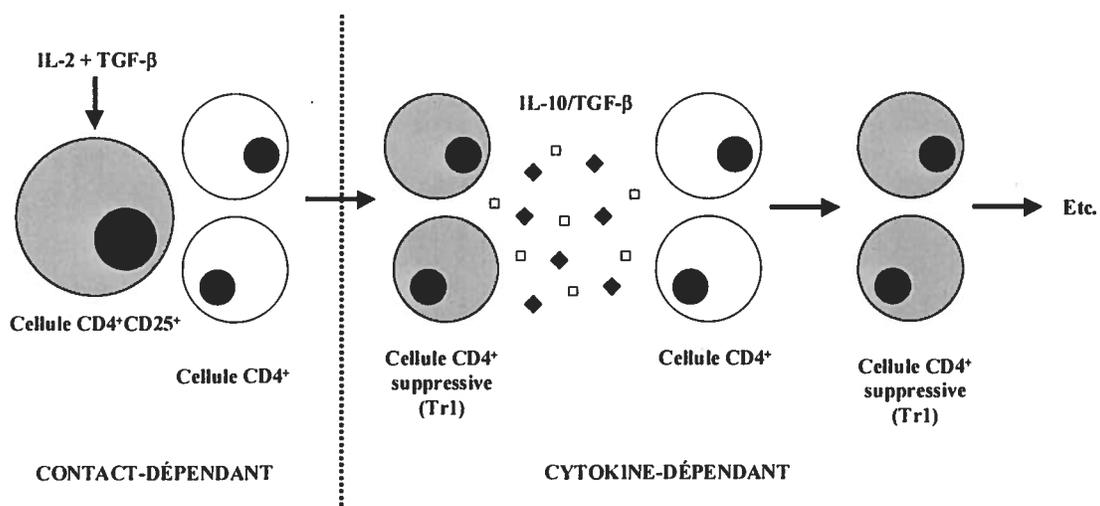
**Figure 2. Tolérance « infectieuse » induite suite à une allogreffe de peau.**

D'autres chercheurs ont démontré que l'activation des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> *ex vivo* pouvait inhiber le syndrome de la greffe versus l'hôte (GVHD) [66]. Celui-ci résulte d'une complication suite à une transplantation de moelle osseuse et est caractérisé par

l'infiltration des organes du receveur par des leucocytes du donneur. Lorsqu'administrées en nombre égal aux  $CD4^+$  totales, les cellules  $CD4^+CD25^+$  cultivées *ex vivo* peuvent induire la tolérance aux cellules T du donneur, diminuant de beaucoup le GVHD [67]. La balance entre les cellules  $CD4^+CD25^+$  et les cellules T conventionnelles du donneur déterminerait ainsi le sort du patient.

### 1.2.2. Mécanisme de tolérance infectieuse

Le principe à la base de la tolérance infectieuse repose sur des interactions cellules/cellules et la production de cytokines immunosuppressives, telles l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . Une cellule  $CD4^+CD25^+$  peut ainsi transférer ses propriétés suppressives à une cellule  $CD4^+$  conventionnelle qui agira par production de cytokines anti-inflammatoires plutôt que par un contact cellulaire. [17]. Cette deuxième génération de Tregs peut produire de l'IL-10 ou du TGF- $\beta$  qui leur confère un phénotype similaire aux Tr1 [68] ou aux  $CD4^+CD25^+$ . La production de TGF- $\beta$  par ces dernières rend leur pouvoir suppressif indépendant du contact cellulaire [17]. C'est en présence d'IL-2 et de TGF- $\beta$  que les cellules  $CD4^+CD25^+$  naturellement présentes en périphérie amorcent cette tolérance qui se propage d'abord aux  $CD4^+$  entrant en contact avec elles, lesquelles deviennent ensuite des Tregs de type Tr1 qui favorisent à leur tour le développement de Tregs additionnelles (Figure 3) [69].



**Figure 3. Mécanisme d'action des cellules  $CD4^+CD25^+$ .**

Suite à leur activation, les barrières d'histocompatibilité entre Tregs et cellules cibles ne constituent plus un frein à la suppression [11]. Comme une Treg peut éduquer les cellules T du donneur ou du receveur à devenir elles-mêmes régulatrices, une approche thérapeutique au rejet de greffe visant à induire la tolérance infectieuse est souhaitable. En combinant la reconnaissance d'une molécule spécifique au greffon avec un RcT artificiel et le potentiel immunosuppresseur des Tregs, il serait possible de créer un micro-environnement protecteur pour les greffes.

### 1.3. Récepteur de cellule T

Le RcT présente plusieurs similitudes avec les immunoglobulines, et est formé d'un hétérodimère de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ou de chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ . La portion extracellulaire est constituée d'une région constante et variable similaires aux fragments Fab des anticorps, soit les domaines C et V des chaînes lourdes et légères [70]. Dans chaque cas, ce sont les parties variables de chacune des chaînes qui contiennent les régions hypervariables (CDR) conférant la spécificité de reconnaissance envers les antigènes ou les ligands [71]. Les chaînes du RcT sont liées entre elles par un pont disulfure situé près de la membrane tout comme les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines qui sont unies à la base de la région constante (Figure 4) [71].

Malgré leurs similitudes structurelles, les propriétés du RcT et des anticorps diffèrent en plusieurs aspects. Les interactions entre un RcT et un peptide ont lieu dans le contexte de la présentation par un CMH de classe I ou II, alors que les immunoglobulines reconnaissent un ligand intact. La reconnaissance par le RcT se doit d'être hautement spécifique puisqu'elle doit permettre d'interagir avec les quelques complexes antigéniques présents parmi un grand nombre de complexes de CMH présentant des antigènes du soi. L'affinité des anticorps envers leurs ligands est cependant de beaucoup supérieure à celle du RcT [72]. L'engagement du RcT permet de transmettre des signaux d'activation dans la cellule via l'interaction de sa portion intracellulaire avec les molécules du CD3 [73].

### 1.3.1. Récepteurs T Artificiels

Un récepteur T artificiel combine les propriétés d'un anticorps à celles d'un RcT. La portion extracellulaire est constituée d'un anticorps simple chaîne (scFv) fusionné à l'unité de signalisation du RcT. L'activation cellulaire par les récepteurs T artificiels permet la reconnaissance d'un ligand indépendamment du CMH. L'utilisation des récepteurs T artificiels a plusieurs applications cliniques comme celle de rediriger le pouvoir cytotoxique de lymphocytes T vers des cellules cancéreuses ou infectées [74]. Une nouvelle forme d'immunothérapie consisterait aussi à induire la sécrétion localisée de cytokines au niveau du greffon afin d'induire la tolérance infectieuse.

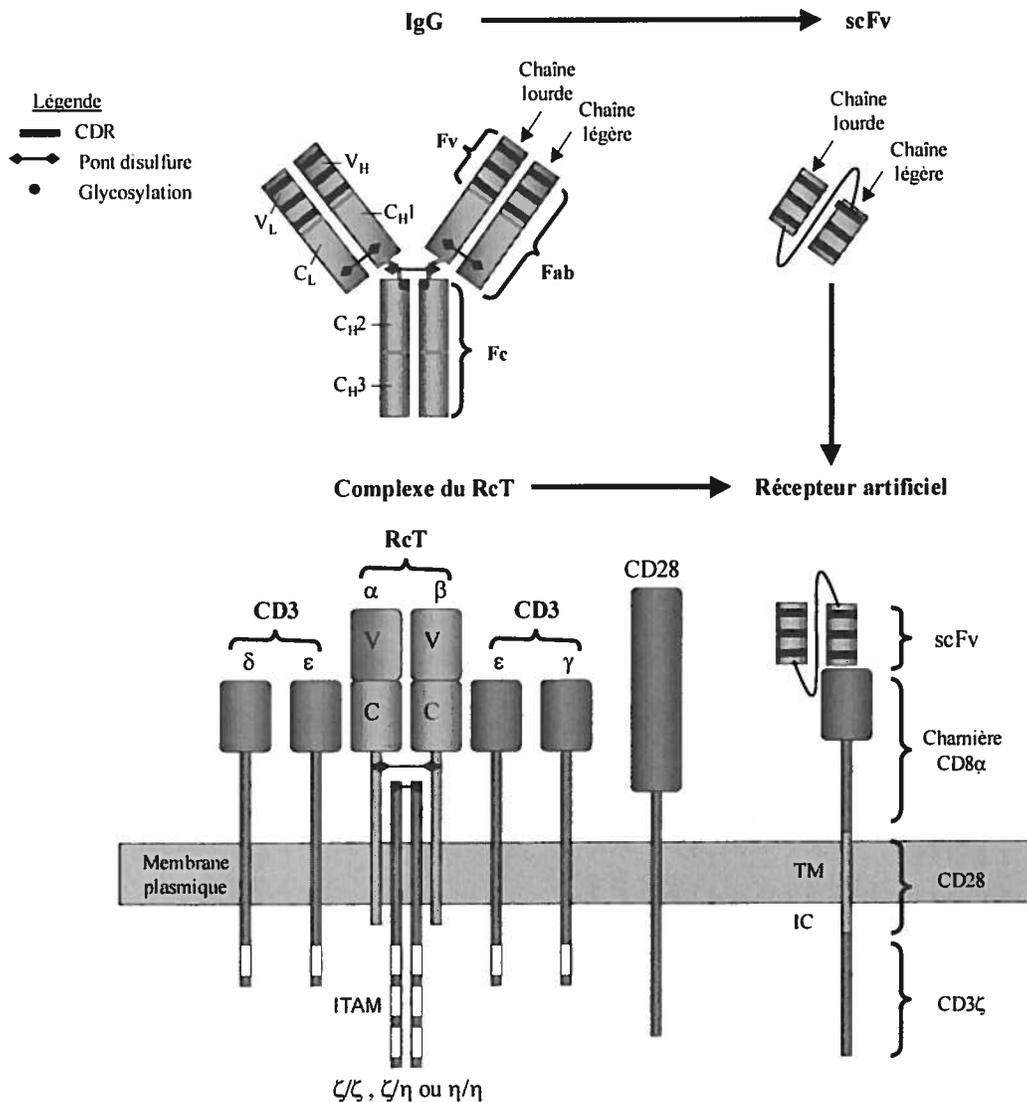


Figure 4. Similitudes entre les IgG, RcT et leurs dérivés.

### 1.3.1.1. Reconnaissance par les récepteurs T artificiels

Les premiers récepteurs chimériques construits étaient constitués de deux chaînes pour reproduire la configuration du RcT. Comme les régions variables des chaînes lourdes et légères d'anticorps sont suffisantes pour reconnaître un antigène, elles ont été fusionnées aux parties constantes des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du RcT. L'expression nécessitait donc deux transfections, une pour chaque chimère [75]. Due à la faible expression des deux transgènes, une alternative fut développée. Cette approche est basée sur le fait que les régions variables des anticorps peuvent être combinées en une seule chaîne si elles sont connectées par une charnière peptidique. Les scFv réunissent les portions variables des chaînes lourdes et légères d'anticorps (Figure 4) [76, 77] et forment la plus petite unité ayant un site de liaison complet à l'antigène. De par leur petite taille, ils ont une meilleure pénétration tissulaire que les anticorps complets tout en étant moins immunogéniques. L'absence de la portion Fc est responsable de cette dernière caractéristique puisque celle-ci est nécessaire pour l'interaction avec les récepteurs Fc. L'utilisation des scFv dans la génération de récepteurs artificiels est donc souhaitable pour des raisons pratiques [75]. Les scFv à utiliser doivent être de faible ou moyenne affinité pour permettre l'activation cellulaire [75], car la transmission du signal peut être inefficace si l'affinité est trop élevée [73]. Le scFv doit également être couplé à la partie de signalisation du récepteur artificiel par une charnière pour augmenter sa distance de la membrane plasmique. En étant flexible, cette charnière permet au scFv d'exercer une meilleure interaction avec le ligand et favorise la signalisation [78]. Une étude a démontré que le choix de la charnière avait un impact direct sur la stabilité et l'affinité du scFv qui corrélait avec les fonctions effectrices [79]. Ces charnières peuvent être d'origine diverse, soit d'IgG, de CD4 ou de CD8 [79].

### 1.3.1.2. Signalisation intracellulaire

L'engagement du RcT génère des signaux d'activation dans la cellule suite à la phosphorylation des molécules du CD3 associées au récepteur. Le complexe CD3 est composé de cinq polypeptides invariants appelés gamma ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ), zeta ( $\zeta$ ) et eta ( $\eta$ ). Les trois premiers sont fortement homologues et possèdent un domaine

extracellulaire de type immunoglobuline [80]. Sur chacune de ces chaînes accessoires se trouvent des motifs d'activation constitués de tyrosines (ITAM) lesquels deviennent phosphorylés après reconnaissance de l'antigène par le RcT (Figure 4). Chaque chaîne  $\zeta$  possède trois motifs ITAM alors que les autres chaînes n'en ont qu'un seul. La chaîne  $\zeta$  est donc en grande partie responsable de la transmission du signal. La phosphorylation est effectuée par des protéines tyrosines kinases de la famille Src (Blk, Fyn ou Lyn) ce qui permet ensuite la liaison au domaine SH2 des protéines tyrosines kinases associées aux Syk, soit ZAP-70 [81, 82]. Comme chaque chaîne est dotée de la capacité de propager un signal de façon autonome, la présence de plusieurs chaînes pour la construction d'un récepteur artificiel n'est pas requise. De par sa capacité accrue à transmettre les signaux, la majorité de ces récepteurs chimériques utilisent comme unité de signalisation la portion intracellulaire de CD3  $\zeta$ . D'autres constructions ont cependant été réalisées avec les chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$ , ou  $\epsilon$  du CD3 ou le récepteur Fc d'immunoglobuline [83, 84, 85].

Pour que l'activation maximale des cellules T ait lieu, une co-stimulation est requise et favorise la prolifération, la production accrue de cytokines dont l'IL-2, l'augmentation de la cytotoxicité tout en empêchant l'anergie [86, 87]. La molécule CD28 est capable d'une telle co-stimulation en interagissant avec ses ligands B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) exprimés par les CPA [88]. Quoique cette molécule contribue au recrutement des protéines tyrosines kinases [89], sa présence seule ne peut engendrer de signaux d'activation et le complexe RcT/CD3 est requis [90]. La co-stimulation permettrait de diminuer la quantité d'antigènes requis pour la cascade de signalisation. Bien qu'à forte dose d'antigènes, la co-stimulation ne soit pas nécessaire, elle est indispensable pour prolonger l'état d'activation [91]. La portion intracellulaire du CD28 peut être fusionnée directement aux ITAM du récepteur T artificiel, ce qui permet la stimulation et la co-stimulation. Par rapport à CD3  $\zeta$ , la position de CD28 est cependant importante puisqu'il a été démontré que le  $\zeta$  placé plus près de la membrane plasmique inhibait le fonctionnement des chimères. Au contraire, en plaçant le CD28 avant le CD3  $\zeta$ , des chercheurs ont démontré que les fonctions effectrices des lymphocytes se trouvaient augmentées (Figure 4) [89, 92]. Plusieurs explications ont été proposées et concernent la conformation de la molécule, l'association aux protéines tyrosine kinases ou l'interaction

avec des régulateurs négatifs qui pourrait être altérée lorsque le CD28 est situé plus loin de la membrane plasmique [92]. Contrairement aux lignées de cellules T, l'expression du récepteur T artificiel avec CD28 à la surface de cellules murines primaires se trouve diminuée de deux à quatre fois. Une étude a démontré que c'est la présence d'un motif di-leucine dans le CD28 murin qui était responsable de cette expression réduite et que le changement de ces acides aminés en glycine permettait d'en augmenter l'expression [74]. Malgré cette baisse d'expression, l'activité de la chimère possédant le CD28 est similaire à la chimère sans CD28. Une séquence similaire se retrouve également dans la queue cytoplasmique du CD28 humain et pourrait causer une diminution d'expression. La mutation du motif di-leucine dans la séquence humaine permettrait ainsi d'améliorer les niveaux d'expression du récepteur T artificiel.

### 1.3.2. Ligand du Récepteur T artificiel

Les récepteurs T artificiels peuvent reconnaître différents ligands si ceux-ci sont exprimés à la surface cellulaire de la cible. Dans le modèle murin utilisé pour étudier l'alloréactivité directe et indirecte, les molécules du CMH-I exprimées par les cellules du donneur constituent une cible de choix pour les récepteurs T artificiels car ce sont des molécules qui diffèrent fréquemment entre donneur et receveur. Les molécules du CMH de classe I (CMH-I) sont des glycoprotéines membranaires hautement polymorphiques exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées. L'interaction peptide/CMH-I permet d'activer les cellules T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> via leur RcT. Chez l'humain, les protéines composant le CMH sont nommées HLA (antigène leucocytaire humain) et contiennent trois locus de classe I nommés HLA-A, B, C. Chez la souris, le CMH est nommé complexe H-2 et possède trois locus appelés K, D et L. Les CMH sont composés de deux chaînes polypeptidiques, une lourde qui traverse la membrane plasmique et une légère associée de manière non-covalente à la première. La chaîne lourde possède trois domaines extracellulaires,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , dont deux ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ) qui forment la cavité de liaison au peptide. La chaîne légère appelée  $\beta_2$ -microglobuline ( $\beta_2$ -m) est invariante et son association est essentielle à la stabilité du CMH. La structure de la  $\beta_2$ -m, tout comme le domaine  $\alpha 3$  ressemble au domaine constant d'une immunoglobuline [93].

#### 1.4. Vecteurs multicistroniques

Les vecteurs ayant plus d'un cistron permettent l'expression simultanée de protéines d'intérêts [94, 95, 96]. Afin de mimer le potentiel immunosuppresseur des Tregs, des cytokines telles l'IL-10 et le TGF- $\beta$  doivent être co-exprimées, ce qui favoriserait l'établissement de la tolérance infectieuse. L'utilisation d'un vecteur bi-cistronique ou tri-cistronique permet de limiter le nombre de constructions devant être introduites dans une cellule. Le troisième cistron peut être occupé par un gène rapporteur comme la protéine fluorescente verte (GFP) ou la luciférase qui offrent un moyen rapide de discriminer les cellules non transfectées. Il faut noter que l'expression issue du troisième cistron peut être réduite d'environ 50% par rapport à l'expression chez les deux premiers cistrons [97]. Pour synthétiser deux ou trois protéines à partir d'un seul ARNm, un vecteur multicistronique doit posséder des séquences d'entrée interne aux ribosomes (IRES) entre chaque cistron. Un promoteur inductible doit également être employé pour contrôler la co-expression de cytokines immunosuppressive.

##### 1.4.1. Site d'entrée interne aux ribosomes

Chez les procaryotes, l'initiation de la traduction résulte d'une interaction entre l'ARNr 16S et une séquence complémentaire Shine-Delgarno sur l'ARNm. Cet appariement de bases permet le recrutement de la sous-unité ribosomale 30S à proximité d'un codon d'initiation AUG aux sites internes de l'ARNm polycistronique [98]. Chez les eucaryotes, la situation est plus complexe puisque des facteurs d'initiation de la traduction (eIF) sont requis. Ce complexe protéique permet la liaison entre la coiffe de 7-méthylguanosine situé à l'extrémité 5' de l'ARNm avec la sous-unité ribosomale 40S chargée des facteurs eIF1, eIF3 et le complexe eIF2/guanosine tri-phosphate (GTP)/méthionyl-ARN de transfert (ARNt). La coiffe reconnue par eIF4E, une des protéines associées au complexe eIF4F comprenant également eIF4G et eIF4A, permet au ribosome d'interagir avec l'ARNm. Le ribosome glisse alors sur l'ARNm jusqu'à la rencontre du codon AUG pour ensuite hydrolyser du GTP via eIF5 et relâcher les facteurs d'amorçage [99]. Contrairement aux bactéries, une seule protéine est normalement produite à partir d'un ARNm.

Les études sur la traduction virale ont permis d'identifier un mode alternatif de recrutement ribosomal utilisant des IRES. Le poliovirus et le virus de l'encephalomyocardite (EMCV), deux picornavirus possédant des ARNm sans coiffe, ont fournis les premiers exemples de traduction non-conventionnelle [100, 101, 102]. Avec des ARN possédant deux cadres de lecture ouverts (ORF) non chevauchants, la traduction indépendante d'une extrémité coiffée devient possible en y insérant un segment de la région 5' non-traduite (UTR) de picornavirus [98]. Des séquences permettant d'initier la traduction ont été retrouvées chez plusieurs virus dont le virus de l'hépatite C (un flavivirus), les pestivirus, les rétrovirus et les lentivirus [103]. Le premier IRES cellulaire a été retrouvé dans l'UTR de la protéine liant la chaîne lourde de l'immunoglobuline (BiP) [104] et ces IRES ont depuis été détectés chez un nombre croissant d'ARNm cellulaires de levures, d'insectes, d'oiseaux et de mammifères [98]. Les interactions entre les IRES et la machinerie traductionnelle dépendent des eIF, dont eIF4G et eIF2 [103].

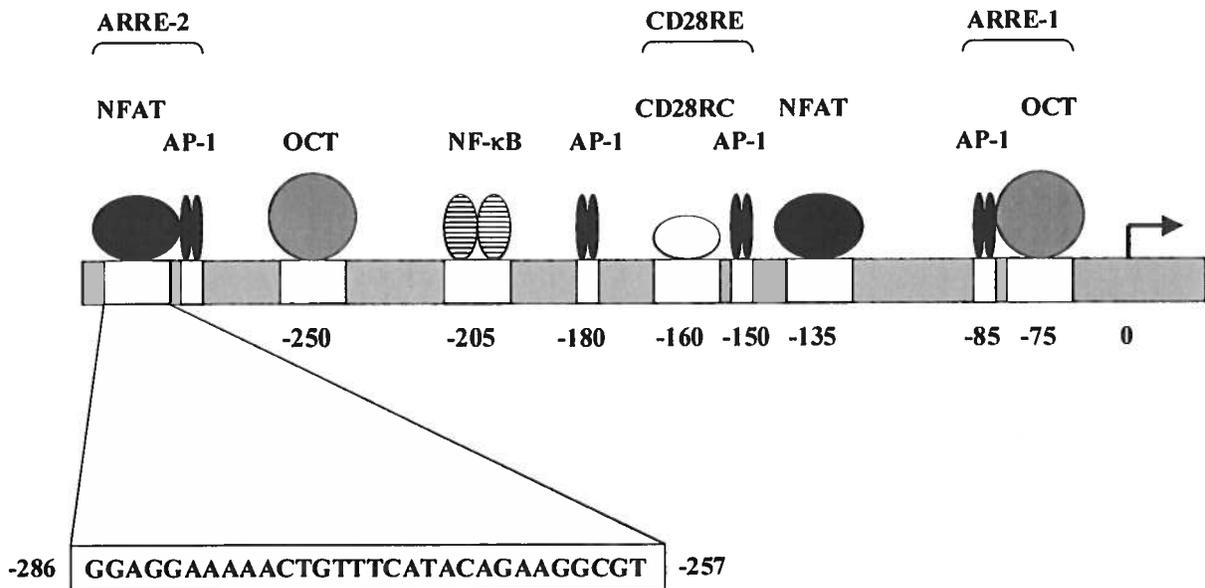
#### 1.4.2. Promoteur inductible

Suite à l'engagement d'un RcT, des protéines kinases C sont activées et la concentration de calcium intracellulaire est augmentée afin de mener à la synthèse d'IL-2 [105]. Comme la synthèse de ce gène dépend de l'activation cellulaire, le promoteur de l'IL-2 (pIL-2) a été choisi afin que les cytokines immunosuppressives ne soient produites qu'après la reconnaissance du greffon par le récepteur T artificiel.

##### 1.4.2.1. Le promoteur de l'IL-2

Le promoteur d'IL-2 contient plusieurs sites auxquels viennent se fixer des facteurs de transcription permettant d'initier et de soutenir la synthèse d'ARNm. À lui seul, le promoteur d'IL-2 possède une faible activité basale mais le recrutement de facteurs de transcription permet de l'augmenter [106]. Il contient dans sa région proximale deux sites d'éléments de réponse au récepteur d'antigène (ARRE) qui favorisent le recrutement de ces protéines. Le premier comporte une séquence pouvant lier la protéine octamère (OCT) et la protéine activatrice (AP-1) alors que ARRE-2 lie AP-1 en conjugaison avec le facteur nucléaire de cellule T activées (NFAT) [107]. AP-1, formé des membres de la

famille Fos et Jun, est adjacent à l'élément de réponse au CD28 (CD28RE). Le site AP-1 situé en position -180 aurait cependant un rôle de répression [108]. D'autres protéines telles NF- $\kappa$ B contribuent à la régulation de l'expression génique (Figure 6). NFAT est quand à elle une protéine présente dans le cytoplasme qui se transloque au noyau suite à l'activation de la cellule. La famille de NFAT comprend cinq membres, NFAT1, 2, 3, 4 et 5 [109]. Uniquement deux des sites NFAT sont montrés à la figure 6, mais trois autres sont présents en position -35, -90 et -160 et stimulent la production d'IL-2. Un des sites NFAT situé à proximité du CD28RE (Figure 5) aurait un effet de synergie sur la transcription [110].



**Figure 5. Éléments de régulation présents sur promoteur d'IL-2.**

#### 1.4.3. Cytokines immunosuppressives

Comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont deux cytokines importantes produites par les cellules Tregs, leur co-expression est souhaitable pour mimer ces dernières. Dans le cadre d'une thérapie pour contrer le rejet de greffe, l'administration systémique de ces cytokines aurait pu être envisagée mais des effets secondaires non-spécifiques seraient survenus. Une thérapie utilisant plutôt des Tregs artificielles reconnaissant spécifiquement des antigènes du greffon permettrait une expression plus localisée d'IL-10 et de TGF- $\beta$ .

#### 1.4.3.1. L'interleukine-10

L'IL-10 a été identifiée en 1989 comme un facteur inhibant la synthèse des cytokines produites par les cellules Th1 [111]. Depuis, il a été prouvé que son spectre d'action était beaucoup plus large puisqu'il affecte aussi la synthèse par les monocytes/macrophages d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, d'IL-8, d'IL-12, de TNF- $\alpha$ , de GM-CSF, des intermédiaires d'azote et d'oxygène réactifs et des molécules de costimulation comme CD80/CD86 [112, 113]. Des souris déficientes pour l'IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>) manifestant des maladies inflammatoires de l'intestin ont permis de démontrer le rôle anti-inflammatoire de cette cytokine [114]. D'autre part, l'IL-10 possède une dualité d'action en agissant comme facteur stimulant la prolifération des thymocytes matures et immatures et en augmentant l'expression de CMH de classe II par les lymphocytes B [115, 116].

L'IL-10 humaine (IL-10h) possède une séquence identique à 73% à celle de souris (IL-10m) et est active sur les cellules humaines et murines [117], contrairement à l'IL-10m qui n'est fonctionnelle qu'avec les cellules murines [112]. Des homologues du gène de l'IL-10 ont été retrouvés chez le virus Epstein-Barr (EBV), l'herpès virus de type 2 chevalin (EHV2), le poxvirus Orf et le cytomégalovirus humain (CMV) [112]. L'IL-10 virale (IL-10v) est pour sa part une protéine non glycosylée de 17 kDa qui possède un fort pouvoir immunosuppresseur [118]. Des études ont démontré que la transfection de tumeurs avec un rétrovirus exprimant l'IL-10m résulte en une immunité anti-tumorale supérieure, alors que la transfection avec l'IL-10v résulte en une suppression immunitaire favorisant la croissance tumorale [119]. De plus, le rejet d'allogreffes murines cardiaques est substantiellement inhibé lorsque la greffe exprime l'IL-10v mais pas lorsqu'elle exprime l'IL-10m [120, 121]. Ceci démontre que l'IL-10v possède une partie des activités biologiques de l'IL-10 cellulaire (IL-10c) et est fortement immunosuppressive. Des études de mutagenèse dirigée ont démontré l'existence de deux domaines sur l'IL-10c, un domaine activateur et un suppresseur, et la présence d'une isoleucine en position 87 est indispensable à l'activité stimulatrice de l'IL-10c. Le changement de cette isoleucine en alanine, le résidu présent chez l'IL-10v, affecte l'affinité du ligand envers son récepteur et élimine les activités stimulatrices de l'IL-10c [115]. L'utilisation de l'IL-10c pour le traitement de diverses maladies auto-immunitaires semble prometteuse

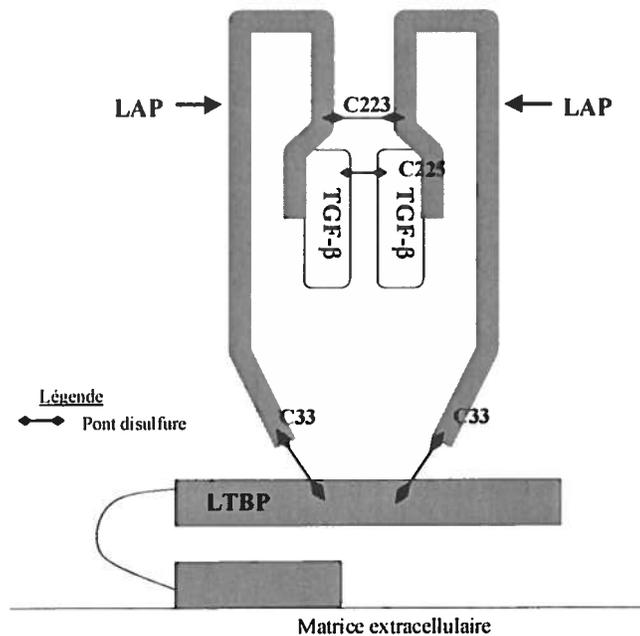
comme le démontrent des études réalisées avec le diabète de type I, la maladie de Crohn et l'arthrite expérimentalement induite [122, 123, 124].

#### 1.4.3.2. Le TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  fait partie d'une famille de facteurs polypeptidiques régulant la croissance et la différenciation cellulaire [125]. Il existe trois isoformes chez les mammifères ayant une forte homologie et qui utilisent le même récepteur pour la transmission du signal. Le TGF- $\beta$ 1 est l'isoforme prédominante dans les organes lymphoïdes et dans le sérum, alors que le TGF- $\beta$ 2 et 3 sont surtout exprimés au niveau du mésenchyme et dans les os [126]. Le TGF- $\beta$ 1 inhibe la prolifération des cellules Th1, Th2, des lymphocytes B, des macrophages, des cellules NK et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$  et  $\alpha$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-2 [127, 128]. Son rôle comme agent anti-inflammatoire a été démontré avec les souris déficiente en TGF- $\beta$ 1 ou son récepteur, qui développent de multiples maladies inflammatoires et auto-immunitaires [126, 129]. Dans les modèles de tolérance orale, la production de TGF- $\beta$ 1 par les cellules Tr3 est responsable de la suppression active et fait dévier les réponses Th1 vers des réponses Th2 [125]. Cette cytokine est capable d'induire l'expression de Foxp3 et favorise le développement du phénotype régulateur des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. La protéine Smad7 qui est induite par le TGF- $\beta$  pour réguler de façon négative sa signalisation est aussi fortement inhibée au niveau transcriptionnel lorsque Foxp3 est exprimé. De plus, l'administration de TGF- $\beta$ 1 s'est avérée efficace dans le contrôle de certaines maladies auto-immunitaires comme le diabète de type I [127, 128, 130, 131].

Le TGF- $\beta$ 1 est naturellement sécrété en tant que précurseur latent dimérique de 390 acides aminés lequel est converti en un dimère mature bioactif de 112 acides aminés après clivage et dissociation de sa portion amino-terminale appelée LAP (latency associated protein) [132, 133]. Cette dissociation peut être réalisée *in vitro* par l'emploi de pH extrêmes alors qu'*in vivo*, des protéases telles la plasmine ou la cathepsine contribueraient à cette activation pour générer l'homodimère de 24 kDa [134]. Une seconde protéine se liant au TGF- $\beta$ 1 latent (LTBP) immobilise le complexe à la matrice

extracellulaire [135]. La protéine LAP est liée au LTBP par un pont disulfure avec la cystéine 33 alors que les résidus C223 et C225 sont requis pour la dimérisation de LAP et l'inactivation du TGF- $\beta$ 1 (Figure 6) [136]. Des études de mutagenèse dirigée ont démontré que la substitution des cystéines 223 et 225 par des sérines permettait de générer des monomères actifs de manière constitutive [132].



**Figure 6. Représentation du complexe latent du TGF- $\beta$ 1.**

L'utilisation du TGF- $\beta$ 1 activé (TGF- $\beta$ 1a) pourrait s'avérer utile en thérapie grâce à son pouvoir immunosuppresseur accru, quoique les études réalisées à ce jour semblent suggérer le contraire. Ainsi, la surexpression de la forme active mais pas la forme latente cause une fibrose sévère de l'intestin et des poumons [133]. De même, des fibroses localisées dans la plupart des organes qui compromettent leur fonction ont été associées à une production excessive de TGF- $\beta$ 1 [137]. Cette pathologie résulte d'une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène, la fibronectine et l'élastine, et d'une diminution de la synthèse de protéines dégradant la matrice [133]. Alors que l'utilisation du TGF- $\beta$ 1 semble protéger contre le diabète, sa surexpression pourrait avoir des effets contraires [138, 139].

Les propriétés immunosuppressives de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ , combinées à un récepteur T artificiel spécifique, pourraient donc être utilisés dans une thérapie cellulaire qui viserait à contrer le rejet de greffe. Les cellules T régulatrices artificielles produiraient deux cytokines anti-inflammatoires à proximité de l'organe transplanté. Le but de cette étude était de générer un système d'expression permettant la sécrétion simultanée d'IL-10 cellulaire ou virale et de TGF- $\beta$  latent ou activé suite à la reconnaissance spécifique de CMH-I de souris donneuse grâce au promoteur de l'IL-2 qui est inductible.

## 2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

### 2.1. Souches bactériennes utilisées

**Tableau I. Génotypes des souches bactériennes utilisées**

Souche Bactérienne <i>Escherichia coli</i>	Génotype	Source
<b>DH5α</b>	F <sup>-</sup> , Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15, Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA69</i> , <i>relA1</i>	InVitrogen <sup>1</sup>
<b>Top10</b>	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	InVitrogen
<b>Top10 F'</b>	F' { <i>lacI</i> <sup>q</sup> Tn10(Tet <sup>R</sup> )}, <i>mcrA</i> , Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	InVitrogen

### 2.2. Tampons et milieux utilisés

**Tableau II. Tampons utilisés pour la manipulation d'acides nucléiques**

Tampon	Composition (à concentration finale 1X)	Source
<b>NEB1</b>	10 mM Bis Tris Propane-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, (pH 7.0)	NEB <sup>2</sup>
<b>NEB2</b>	10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM NaCl, 1 mM DTT, (pH 7.9)	NEB
<b>NEB3</b>	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, 1 mM DTT, (pH 7.9)	NEB
<b>NEB4</b>	20 mM Tris-acétate, 10 mM MgOAc, 50 mM KOAc, 1 mM DTT, (pH 7.9)	NEB
<b>Tampon de PCR DeepVent</b>	20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 0.1% Triton X-100, (pH 8.8)	NEB
<b>Tampons d'ADN ligase T4</b>	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25μg/ml BSA, (pH 7.5)	NEB
<b>5X First Strand Buffer</b>	50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl <sub>2</sub> , (pH 8.3)	InVitrogen

<sup>1</sup> InVitrogen, Burlington, Canada

<sup>2</sup> New England BioLabs (NEB), Pickering, Canada

**Tableau III. Autres tampons et milieux utilisés**

<b>Tampon/Milieu</b>	<b>Composition (concentration 1X)</b>
<b>LB</b>	1% Bacto-Tryptone, 0.5% Extrait de levure, 170 mM NaCl
<b>2xYT</b>	1.6% Bacto-Tryptone, 1% Extrait de levure, 85 mM NaCl
<b>PBS</b>	150 mM NaCl, 3mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (pH 7.4)
<b>PBS-T</b>	150 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.05% Tween-20, (pH 7.4)
<b>Solution I</b>	50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, (pH 8.0)
<b>Solution II</b>	0.2 N NaOH, 1% SDS
<b>Solution III</b>	150 mM KOAc, 1% Acide Formique
<b>Tampon d'extraction D'ADN</b>	1 M Tris-HCl, 0.5M EDTA, (pH 8.0)
<b>Solution saline</b>	0.9% NaCl, 10 mM EDTA
<b>Tampon anti-coagulation</b>	PBS, 1% BSA, 0.02% NaN <sub>3</sub> , 0.2% EDTA
<b>Tampon de lyse érythrocytaire</b>	0.15 M NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0.1 mM EDTA
<b>Tampon β-Gal 2X</b>	100 mM tampon Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM β-Mercaptoéthanol, 0.67 mg/ml ONPG, (pH 7.3)
<b>TBE</b>	89 mM Tris Base, 89 mM Acide Borique, 2 mM EDTA, (pH 7.4)
<b>TAE</b>	40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA, (pH 8.3)
<b>Versène</b>	PBS, 0.684 mM EDTA
<b>Tampon de charge d'ADN</b>	0.25% bleu de bromophénol, 40% glycérol
<b>Tampon d'électroporation</b>	120 mM KCl, 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 25 mM HEPES, 2 mM MgCl <sub>2</sub> ,

2.3. Oligonucléotides utilisés

**Tableau IV. Séquence des amorces utilisées\***

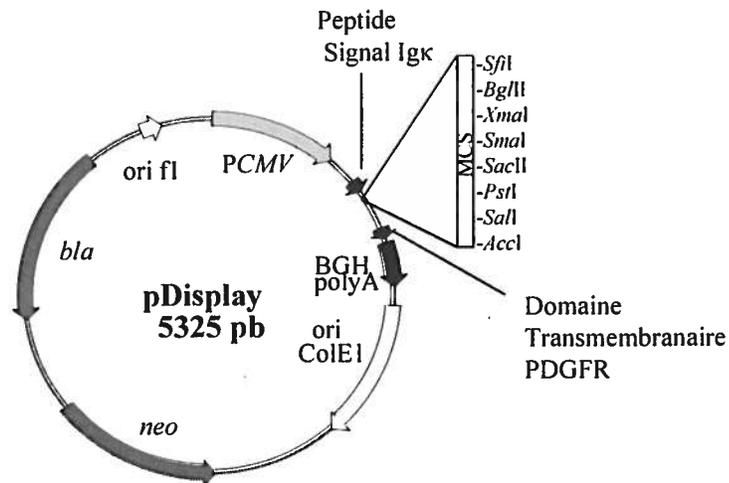
<b>#</b>	<b>Nom</b>	<b>Séquence 5'→ 3'</b>
1	<b>5' IRES</b>	CGAACCGGTATCTAGGGCGGCCAATTCCG
2	<b>3' IRES</b>	GTGTCTAGATTATCATCGTGTTTTTCAAAGG
3	<b>5' PIL-2</b>	CTTTTCAATCGATTACTCTTGCTCTTGTCACCACAATATG
4	<b>3' PIL-2</b>	CATCCTGTGAATTCTGGCAGGAGTTGAGGTTACTGTGAGTAG
5	<b>5' CD8α</b>	AAAGATCTGCGGCCGCATCAGTCATCAGCAACTCGGTGATG
6	<b>3' CD8α</b>	CCAGATCCGCGGATCACAGGCGAAGTCCAATCCGGTCCC
7	<b>5' mZeta</b>	ACAGAGCCC GCGGCTGCTGGATCCCAA ACTCT
8	<b>3' mZeta</b>	GCCCTCGAGTGGTGAAATCCCATGGCTGTTA
9	<b>5' ICmZeta</b>	TTTGCCGCGGTCTCTAGAGCAA AATTCAGCAGGAGTG
10	<b>BGhr</b>	TAGAAGGCACAGTCGAGG
11	<b>5' CD28h</b>	CCCGGACCTCCGCGGCCCTTTTGGGTG
12	<b>3' CD28h</b>	GGCGTCCGTGTCTAGAGCGATAGGCTG

13	5'S3	GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGG
14	5'Actine	GAGGGAAATCGTGCGTGACATCAA
15	3'Actine	GGAACCGCTCGTTGCCAATAGTGA
16	5'IL-10h	CCACAAGCTTGACTTGCAAAGAAGGCATG
17	3'IL-10h	GTCTCTAGAGTCGCCACCCTGATGTCTCAG
18	5'IL-10v	CAAGACCCAGACGCCAAGGGCGCATG
19	3'IL-10v	CATGCGCCTTGGCGTCTGGGTCTTG
20	5'SR $\alpha$	TGCTTGCTCAACTCTACGTC
21	3' SR $\alpha$	ACTGCATTCTAGTTGTGGTT
22	5'TGF- $\beta$ a	GATTCAGCGCTCACTCGAGTTCTGACAGCAAAGATAAC
23	3' TGF- $\beta$ a	GTTATCTTTGCTGTCAGAACTCGAGTGAGCGCTGAATC
24	UP	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
25	RP	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
26	T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
27	T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGA
28	Oligo dT	(G/C/A)TTTTTTTTTTTTTTTT

\*Les sites de restrictions utilisés sont soulignés dans le tableau.

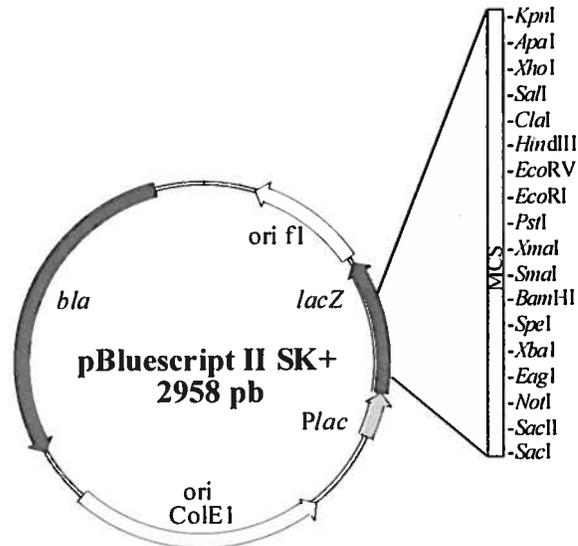
## 2.4. Vecteurs utilisés

### 2.4.1. pDisplay



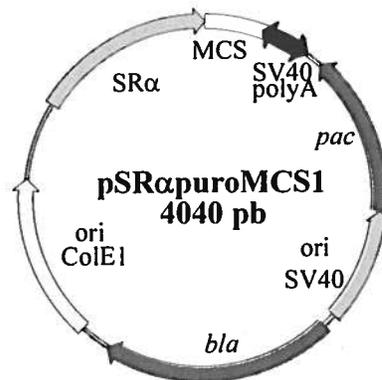
**Figure 7. Représentation du vecteur pDisplay.** Le vecteur pDisplay (InVitrogen, Figure 7) permet l'expression en cellules eucaryotes de protéines à la surface cellulaire grâce au domaine transmembranaire présent dans le vecteur. Un peptide signal situé en 5' du site de clonage multiple (MCS) permet de cibler la protéine vers la voie de sécrétion. Ce vecteur de 5325 pb contient le promoteur CMV, un signal de polyadénylation, l'origine de répllication ColE1, l'origine de répllication de fl, et les gènes *bla* et *neo* qui confèrent respectivement la résistance à l'ampicilline pour la sélection en bactéries et à la G-418 pour la sélection en cellules eucaryotes.

### 2.4.2. pBluescript II SK+



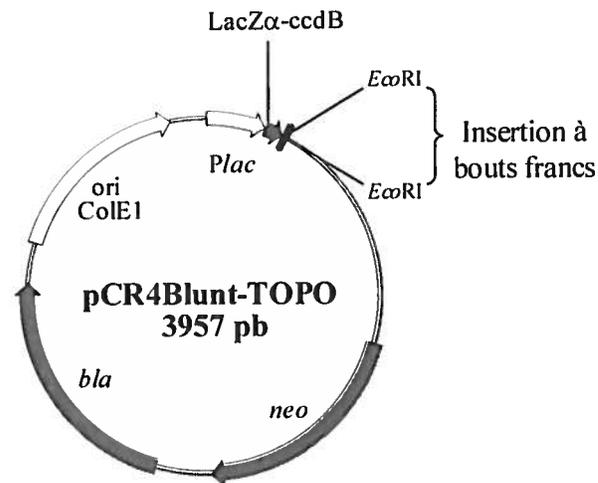
**Figure 8. Représentation du vecteur pBluescriptII SK+.** Le vecteur pBluescript II SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, Figure 8) permet le repérage rapide de colonies recombinantes. Le MCS contient 18 sites de restriction uniques qui sont placés à l'intérieur du gène *lacZ* codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Cette enzyme dégrade le X-gal en métabolite bleu. La transformation de souches bactériennes *lacZ* $\Delta$ M15 avec un plasmide sans insertion résulte en la formation de colonies bleues, alors qu'une insertion dans *lacZ* perturbe le cadre de lecture et rend l'enzyme non-fonctionnelle. Ce vecteur de 2958 pb contient l'origine de réplication ColE1 et le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline pour la sélection en bactéries.

### 2.4.3. SR $\alpha$ puroMCS1



**Figure 9. Représentation du vecteur SR $\alpha$ puroMCS1.** Le vecteur SR $\alpha$ puroMCS1 (Figure 9) de 4040 pb permet l'expression de protéines en cellules eucaryotes. Ce dernier contient le promoteur SR $\alpha$  [140], le signal de polyadénylation bidirectionnel de SV40 pour terminer la transcription, l'origine de réplication ColE1 et l'origine de réplication du SV40. Il contient le gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline en bactéries et le gène *pac* qui confère la résistance à la puromycine aux cellules eucaryotes. Les vecteurs pSR $\alpha$ neoMCS1, pSR $\alpha$ blastMCS1 et pSR $\alpha$ hygroMCS1 contiennent les mêmes éléments mais possèdent des gènes de résistance différents (*neo*, *bsr* et *hph*) conférant respectivement la résistance au G-418, blasticidine S et hygromycine B.

#### 2.4.4. pCR4Blunt-TOPO



**Figure 10. Représentation du vecteur pCR4Blunt-TOPO.** Le vecteur pCR4Blunt-Topo (InVitrogen, Figure 10) permet l'insertion directe de fragments de PCR ayant des extrémités franches. Ce système est basé sur une topoisomérase I liée de manière covalente aux extrémités 3' du vecteur qui catalyse la réaction d'intégration. Ce plasmide possède le gène toxique *ccdB* fusionné au fragment *LacZα*. L'insertion d'un produit de PCR élimine *ccdB* ce qui ne permet que la croissance des clones recombinants. Ce vecteur de 3957 pb contient le promoteur *lac*, l'origine de répllication *ColE1*, et les gènes *bla* et *neo* qui confèrent respectivement la résistance à l'ampicilline et à la kanamycine.

#### 2.5. Clonage d'acides nucléiques

##### 2.5.1. Extraction d'ADN génomique

Les extractions d'ADN génomique ont été effectuées sur des cellules en culture ou des PBMC (cellules sanguines périphériques mononucléées) préalablement lavées avec du PBS. Deux lavages ont été réalisés avec le tampon d'extraction en centrifugeant les cellules 5 min. à 500 x g entre chaque lavage. Suite à une incubation de 10 min. sur glace, les cellules ont été centrifugées et le culot a été resuspendu avec le tampon d'extraction contenant 0.35 µg/µl de protéinase K et 1 % de SDS, puis incubé 16 hrs à 45°C. Suite à une extraction au phénol et deux extractions au phénol/chloroforme, l'ADN a été précipité avec deux volumes d'éthanol. L'ADN a été dosé avec un spectrophotomètre GeneQuant II (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Canada) à 260 nm.

### 2.5.2. Extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol

Un volume égal de phénol/chloroforme (1:1 v/v) a été ajouté aux échantillons d'ADN. Après agitation au vortex et centrifugation de 5 min. à 21,000 x g, la phase aqueuse a été récupérée. Une seconde extraction au phénol/chloroforme a été réalisée. L'ADN a été précipité par l'ajout de 1/10 de volume de NaOAc (pH 5.2), 0.8 mg/ml de glycogène et 2.5 volume d'éthanol froid suivi d'une centrifugation de 10 min. à 21,000 x g. Le culot a été séché 2 min. à 55°C pour être resuspendu dans un volume d'eau stérile approprié.

### 2.5.3. Extraction d'ARN et synthèse d'ADN complémentaire

Les extractions d'ARN ont été réalisées sur des cellules en culture préalablement lavées au PBS. Pour un maximum de  $10 \times 10^6$  cellules, 750  $\mu$ l de Trizol (InVitrogen) combiné à 250  $\mu$ l d'eau ont été employés afin de solubiliser les cellules. Après une incubation sur glace de 5 min., 0.2 volume de chloroforme ont été ajoutés. Suite à une incubation à température ambiante de 10 min., une centrifugation de 15 min. à 11,500 x g a été effectuée pour séparer les phases. L'ARN a été précipité par l'ajout d'un volume d'isopropanol et incubation de 20 min. à température ambiante. L'ARN a été centrifugé 10 min. à 11,500 x g et le culot a été rincé avec de l'éthanol à 70%, séché et resuspendu dans de l'eau stérile pour être dosé avec le spectrophotomètre GeneQuant II à 260nm.

Afin de générer de l'ADNc, 5  $\mu$ g d'ARN ont été combinés à 25  $\mu$ g/ml d'oligo dT et 0.5 mM de dNTPs dans un volume final de 20  $\mu$ l. Le mélange a été chauffé 5 min à 65°C et refroidi rapidement sur glace. Le tampon 5X First-Strand Buffer a été ajouté avec 1/10 de volume de DTT 0.1 M et 1/20 de volume d'inhibiteur de ribonucléase (40U/ $\mu$ l) (InVitrogen). Après une incubation de 2 min. à 42°C, la réaction a été amorcée par l'ajout de 1/20 de volume de transcriptase inverse (RT) Superscript II (200U/ $\mu$ l) (InVitrogen). La réaction a été incubée 50 min. à 42°C puis l'enzyme a été inactivée 15 min. à 70°C.

#### 2.5.4. Réaction de polymérase en chaîne (PCR) et mutagenèse dirigée

La liste des amorces qui ont été utilisées pour les réactions de PCR sont présentées au tableau IV et ont été produites par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Montréal, Canada). Chaque réaction contenait le tampon de PCR Deep Vent, 100 ng d'ADN, 0.2 mM de dNTPs, 10 pmol de chacune des amorces et 1 U de TAQ polymérase combiné à 0.04 U de polymérase DeepVent (NEB) dans un volume final de 50 µl. La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur PTC-200 (MJ Research, Toronto, Canada). Les conditions utilisées étaient : 6 min. à 94°C, suivie de 25 à 30 cycles de dénaturation d'une min. à 94°C, hybridation de 1.5 min. à 55°C et élongation d'une min. à 72°C. Une élongation finale de 6 min. à 72°C a été effectuée pour terminer l'amplification

La technique d'*overlap extension* a été utilisée pour créer des mutations dirigées [141]. Celle-ci consiste à réaliser parallèlement deux réactions de PCR sur le même brin d'ADN. Deux amorces qui se chevauchent sur quelques nucléotides à l'endroit à muter sont utilisées individuellement dans chacune des réactions avec les amorces 5' ou 3' distales du brin d'ADN. Après une purification des deux sous-produits de PCR, ils sont combinés dans un rapport de 1:1 pour assembler le produit final en utilisant les amorces distales.

#### 2.5.5. Manipulation d'extrémités d'ADN

##### 2.5.5.1. Génération d'extrémités franches

Afin de générer des bouts francs avec des extrémités 3' saillantes, l'ADN polymérase du phage T4 a été utilisée. Les réactions ont été effectuées dans un volume de 100 µl contenant de l'eau, du tampon NEB4, 0.1 mM de dNTPs et 1 U d'enzyme par µg d'ADN. Après une incubation de 20 min. à température ambiante, l'ADN a été extrait au phénol/chloroforme et précipité à l'éthanol. Le fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* a été utilisé pour générer des bouts francs à partir d'extrémités 5' saillantes. Les réactions ont été effectuées dans un volume de 100 µl contenant le tampon NEB2, 2 mM

de dNTPs et 1 U d'enzyme par  $\mu\text{g}$  d'ADN. Après une incubation d'une heure à  $37^\circ\text{C}$ , l'ADN a été extrait au phénol/chloroforme puis précipité à l'éthanol.

#### 2.5.5.2. Déphosphorylation

Pour empêcher la recircularisation du vecteur lors de la ligation, la phosphatase alcaline intestinale de veau (NEB) a été employée pour déphosphoryler les extrémités 5' d'ADN. Les enzymes de restriction ont été inactivées à  $70^\circ\text{C}$  ou par extraction au phénol/chloroforme, puis l'ADN a été précipité à l'éthanol. Le culot a été resuspendu dans du tampon NEB3 et 20 U de CIP ont été ajoutés dans un volume final de  $50\ \mu\text{l}$ . Les échantillons ont été incubés 30 min. à  $37^\circ\text{C}$  puis l'ADN, purifié sur gel d'agarose.

#### 2.5.6. Digestion et ligation

Cinq  $\mu\text{g}$  d'ADN ont été digérés dans un milieu contenant 5 U d'enzyme de restriction et le tampon NEB approprié dans un volume final de  $50\ \mu\text{l}$ . Les échantillons ont été incubés à la température recommandée pendant 1 à 3 heures. Si nécessaire, l'enzyme utilisée a été inactivée pour effectuer des digestions séquentielles avec une autre enzyme nécessitant un tampon différent. Les ADN ont été purifiés sur gel d'agarose et passage sur une colonne filtre de type Spin-X (Corning, Acton, MA), QIAquick (Qiagen, Mississauga, Canada) ou extrait au phénol chaud. La ligation d'un fragment d'ADN à un vecteur possédant des extrémités cohésives a été effectuée avec un rapport molaire de 3:1 (insert : vecteur) avec une concentration d'ADN totale de 10 à  $20\ \text{ng}/\mu\text{l}$ . Lorsque le fragment et le vecteur déphosphorylé possédaient des extrémités franches, un rapport molaire de 5:1 ou 10:1 (insert : vecteur) avec une concentration d'ADN totale de 50 à  $100\ \text{ng}/\mu\text{l}$  a été utilisée. Les ligations ont été effectuées dans un volume final de  $10\ \mu\text{l}$  contenant 1/10 de volume de tampon d'ADN ligase T4 et 1/20 de volume d'ADN ligase T4 puis incubées 30 min. à  $37^\circ\text{C}$ . Lorsque possible, une digestion post-ligation a été effectuée pour diminuer le nombre de colonies non-recombinantes. Après inactivation de la ligase à la chaleur, le volume de l'échantillon a été augmenté avec de l'eau pour contenir 1/10 de volume de tampon de digestion NEB et 1/10 de volume d'enzyme de restriction, puis une incubation de 30 min. à la température recommandée a été effectuée. Pour le clonage des produits de PCR dans le vecteur pCR4Blunt-Topo, les

recommandations du fabricant ont été suivies. Le rapport molaire utilisé était de 1:1 (insert : vecteur) dans un volume de 6 µl. Outre l'eau, le produit de PCR et le vecteur, 200 mM de NaCl (InVitrogen) et 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (InVitrogen) ont été ajoutés et la réaction s'est déroulée 5 min. à la température ambiante.

#### 2.5.7. Purification d'ADN sur gel

Les échantillons d'ADN précipités ont été resuspendus dans 50 µl d'eau et combinés à 10 µl de tampon de charge. Le gel d'agarose a été préparé dans du tampon TAE contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium et la migration a eu lieu à un voltage constant de 7 V/cm. Après avoir observé les bandes sous une lampe UV, l'ADN a été récupéré par découpage du gel. L'agarose restante a été éliminée par différentes techniques, soit Spin-X, QIAquick ou phénol chaud, après quoi un dosage a été effectué par densitométrie avec un appareil AlphaImager System 3400 (Alpha Innotech, San Leandro, CA) en comparant les inconnus à une échelle de poids moléculaire. L'échelle utilisée consistait en 3 µg du bactériophage λ digéré avec l'enzyme *Pst*I et la quantification d'ADN a été effectuée avec le logiciel AlphaEase (Alpha Innotech).

La méthode de purification par Spin-X consiste à déposer le gel contenant l'ADN finement haché sur un filtre de 0.45 µm d'une colonne de centrifugation. Deux cycles de gel et dégel de 10 min. à -80°C ont été effectués et une centrifugation à 13,000 x g pendant 10 min. a permis d'extraire l'ADN. Le matériel récupéré au fond de la colonne a été précipité à l'éthanol puis resuspendu dans un volume d'eau approprié avant d'être dosé.

Les colonnes QIAquick retiennent l'ADN sur une membrane de silice par centrifugation. Les réactifs proviennent de la trousse QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen) qui contient le tampon de dissolution, le tampon de lavage et le tampon d'élution. La bande découpée a été pesée et dissoute 10 min. à 50°C avec 3 volumes de tampon de dissolution. Après avoir ajouté 1 volume d'isopropanol, l'échantillon a été déposé sur la membrane de silice et centrifugé 1 min. à 15,000 x g. L'ADN a été lavé par ajout de 750 µl de tampon de lavage et centrifugation d'une min. à 15,000 x g. L'élution

a été effectuée par ajout de 30 à 50  $\mu\text{l}$  de 10 mM de Tris-HCl à pH 8.5, en laissant reposer la colonne 1 min., et centrifugation d'une min. à 15,000 x g.

La méthode du phénol chaud nécessite l'utilisation d'agarose à faible point de fusion (Cambrex, East Rutherford, NJ). La bande découpée a été pesée, 1 volume d'eau (p/v) et 1/10 de volume de NaOAc ont été ajoutés, puis l'échantillon a été incubé 5 min. à 70°C pour faire fondre l'agarose. Un volume de phénol a été ajouté et le mélange a été agité au vortex avant d'être incubé 15 min. à 70°C. Après une centrifugation de 10 min. à 21,000 x g, la phase aqueuse a été prélevée et une seconde extraction au phénol a été réalisée. Deux extractions au phénol/chloroforme suivies d'une précipitation à l'éthanol ont permis d'obtenir l'ADN purifié.

#### 2.5.8. Transformation bactérienne

Le mélange de ligation ou l'ADN purifié a été ajouté à 50  $\mu\text{l}$  de bactéries compétentes et le tout incubé sur glace pendant 15 min. Les bactéries ont été soumises à un choc thermique de 1.5 min. à 42°C et immédiatement transférées sur glace. Un ml de milieu de culture LB a été ajouté et l'échantillon incubé pendant 1 heure à 37°C. Des volumes de 10  $\mu\text{l}$  et 100  $\mu\text{l}$  ont été étalés sur milieu LB contenant 1.5% d'agar et les antibiotiques à la concentration requise. Les bactéries transformées restantes ont été centrifugées 1.5 min. à 10,000 x g, resuspendues dans 100  $\mu\text{l}$  de LB etensemencées sur gélose. La sélection bactérienne s'est effectuée avec 100  $\mu\text{g/ml}$  d'ampicilline, 50  $\mu\text{g/ml}$  de kanamycine, 100  $\mu\text{g/ml}$  de blastidine S ou 100  $\mu\text{g/ml}$  d'hygromycine B.

#### 2.5.9. Criblage de clones recombinants

Pour identifier les clones recombinants, l'ADN plasmidique a été extrait par lyse alcaline. Des colonies isolées sur gélose ont été inoculées dans 1 ml de milieu LB contenant l'antibiotique de sélection. Les cultures ont été incubées sous agitation à 37°C pendant 16 à 18 heures. Suite à une centrifugation à 21,000 x g pour 1 min., les culots ont été resuspendus dans 100  $\mu\text{l}$  de solution I contenant 0.5 mg/ml de lysozyme. Les échantillons ont été agités au vortex et 200  $\mu\text{l}$  de solution II ont été ajoutés puis mélangés par inversion. Après l'ajout de 150  $\mu\text{l}$  de solution III, une centrifugation de 5 min. à

21,000 x g a été effectuée. Le surnageant a été récupéré et 1 ml d'éthanol a été ajouté. Les tubes ont été incubés 20 min. à -20°C puis centrifugés 10 min. à 21,000 x g. Les culots ont été séchés 2 min. à 55°C puis resuspendus dans 20 µl d'eau. Afin de cribler les clones positifs, des digestions enzymatiques ont été effectuées avec 8 µl d'ADN resuspendu combinés à 1/10 de volume de tampon, d'enzyme de restriction et 0.1 mg/ml de RNase A dans un volume final de 10 µl. Les réactions ont été incubées 1 heure à la température recommandée avant d'être déposés sur gel d'agarose analytique. Des gels de 8 x 10.5 cm contenant entre 1 et 2% d'agarose selon la taille des fragments à analyser ont été préparés dans du tampon TBE contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium. Quatre µl de tampon de charge ont été ajoutés aux digestions et l'électrophorèse s'est déroulée sous voltage constant de 10 V/cm, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel.

#### 2.5.10. Préparation d'ADN à grande échelle

La préparation d'une grande quantité d'ADN a été effectuée par lyse alcaline. Les colonies recombinantes ont été inoculées dans 100 ml de LB contenant l'antibiotique approprié puis incubées à 37°C pendant 16 à 18 heures. Deux ml de ces cultures ont été prélevés, centrifugés 15 secondes à 21,000 x g, puis le culot a été resuspendu dans 1 ml de 50% LB/glycérol pour être conservé à -80°C. Le reste de la culture a été séparé en deux tubes de 50 ml et centrifugé 15 min. à 2,700 x g. Les culots bactériens ont été resuspendus dans 8 ml de solution I contenant 1.5 mg/ml de lysozyme. Après une incubation à la température ambiante de 10 min., 8 ml de solution II ont été ajoutés puis 6 ml de solution III ont été rajoutés. Après une centrifugation de 10 min. à 2,700 x g, le surnageant a été filtré sur Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA). Un volume d'isopropanol a été ajouté au filtrat et l'ADN a été précipité par centrifugation de 20 min. à 3 300 x g. Les culots ont été séchés 12 min. à 55°C puis resuspendus dans 450 µl d'eau, 50 µl de NaOAc 3 M (pH 5.2) et 0.2 mg/ml de ribonucléase A avant d'être incubés 15 min. à 70°C. Des extractions au phénol/chloroforme ont été effectuées jusqu'à ce qu'aucun matériel ne soit présent à l'interface des phases aqueuses et organiques. L'ADN plasmidique a été précipité à l'éthanol et resuspendu dans 100 µl d'eau.

### 2.5.11. Séquençage

La technique de séquençage utilisée est basée sur la méthode de Sanger [142] à la différence que les terminateurs de chaînes possèdent un fluorochrome différent correspondant à chaque base et pouvant être détectés avec le séquenceur automatique CEQ 2000XL (Beckman-Coulter, Mississauga, Canada). Chaque réaction contenait 50 fmol d'ADN préalablement dénaturé 1 min. dans un thermocycleur à 96°C. Le volume final a été complété à 20 µl avec 3.2 pmol d'amorce, et 4.5 µl des réactifs CEQ™ DTCS Kit (Beckman-Coulter) contenant 0.25 µl d'ADN polymérase, 0.5 µl de chacun des 4 ddNTPs, 0.25 µl de dNTPs et 2 µl de tampon. Le PCR de séquençage consistait en 40 cycles de dénaturation de 20 secondes à 96°C, hybridation de 20 secondes à 50°C et élongation de 4 min. à 60°C. Les produits de PCR ont été précipités à l'éthanol 95% et lavés à l'éthanol 70%. Après avoir été séchés, les culots ont été resuspendus dans de la formamide déionisée (Beckman-Coulter) et l'injection a été effectuée avec les conditions de migration LFR-1 ou LFR-3. Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel Chromas (Technelysium Ltd, Tewantin, Australie).

## 2.6. Culture cellulaire

### 2.6.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires Hela (ATCC, Manassas, VA, #CCL-2), 293T/17 (ATCC, #CLR-11268), HL-60 (ATCC, # CCL-240), THP-1 (ATCC, #TIB-202), Jurkat 77.6 (gracieuseté du Dr Pascale Duplay) et BW5147.3 (ATCC, #TIB-47) ont été maintenues dans un incubateur à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture utilisé était du DMEM pour les trois premières lignées ou du RPMI pour les autres contenant 10 % (v/v) de SVF (Sérum de veau fœtal) décomplémenté 30 min. à 55°C et 1 % (v/v) d'un mélange de pénicilline, streptomycine et glutamine (PSG) (InVitrogen). Les cellules adhérentes ont été décollées avec du versène.

### 2.6.2. Isolation de PBMC

Les PBMC ont été obtenus de donneurs volontaires ou de souris à partir de sang préalablement dilués dans une solution saline. Un volume de Ficoll-Paque Plus

(Amersham Biosciences) a été ajouté aux échantillons qui ont été centrifugés 30 min. à 400 x g. L'interface a été prélevée et lavée deux fois avec 15 ml de solution saline. Après une centrifugation de 10 min. à 300 x g, le culot a été resuspendu dans du milieu DMEM complet, contenant le SVF et la PSG.

### 2.6.3. Transfections transitoires

Les transfections transitoires avec la polyéthylèneimine (PEI) ont été effectuées en solubilisant 2 µg d'ADN dans 100 µl de 150 mM NaCl stérile puis en ajoutant 30 µg/ml de PEI (Polysciences, Warrington, PA). Les échantillons ont été incubés 10 à 30 min. à la température ambiante puis déposés goutte-à-goutte sur  $5 \times 10^5$  cellules placées dans 2 ml de milieu de culture complet dans une plaque de 6 puits. Suite à une incubation à 37°C dans 5 % de CO<sub>2</sub>, les transfections ont été analysées au microscope à fluorescence après 24 heures ou au cytomètre après 48 heures. La méthode Fugène a été réalisée en plaçant 3 µl de Fugène 6 (Roche Diagnostics, Laval, Canada) dans 100 µl de milieu de culture sans SVF ni PSG. Deux µg d'ADN ont été rajoutés, puis les échantillons ont été incubés 15 min. à la température ambiante avant d'être déposés goutte-à-goutte sur les cellules. L'incubation et l'analyse se sont déroulées dans les mêmes conditions que pour la technique précédente.

### 2.6.4. Transfections stables

Des transfectants stables ont été obtenus par ajout d'antibiotiques 24 à 72 heures post-transfection. La puromycine a été utilisée à une concentration de 1 µg/ml, le G-418 à 1 mg/ml et la blasticidine S à 4 µg/ml. Environ  $10 \times 10^6$  cellules ont été utilisées pour les transfections par électroporation. Les cellules préalablement lavées au PBS ont été resuspendues dans 500 µl de tampon d'électroporation et placées dans une cuvette de 0.4 cm d'espacement (Bio-Rad, Hercules, CA) contenant entre 10 et 20 µg d'ADN. Elles ont été électroporées à une capacitance de 960 µF à un voltage de 350 V avec un appareil Gene Pulser (Bio-Rad). Les cellules ont été incubées sur glace 15 min. et resuspendues dans le milieu de culture approprié.

La transfection avec le nucleofector™ (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD) requiert un maximum de 5 µg d'ADN dans un volume de 1 à 5 µl d'eau. Les cellules ont été cultivées jusqu'à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules/ml puis resuspendues dans 100 µl de la solution V fournie avec la trousse. La nucléofection a été effectuée dans les 20 minutes suivant l'addition de la solution. L'ADN a été ajouté, les échantillons ont été transférés dans une cuvette Amaxa puis les nucléofections ont été effectuées avec des programmes pré-déterminés. Les cellules ont été mises en culture dans un volume de 2 ml de milieu dans une plaque de 6 puits.

Réalisée en plaque de 24 puits, les transfections avec l'agent Dreamfect (OzBiosciences, Marseille, France) ont été effectuées en utilisant  $2.5 \times 10^5$  cellules par puit. 0.5 µg d'ADN dilué dans 50 µl de milieu sans SVF ni PSG ont été ajoutés à un mélange de 2 µl de Dreamfect dilué dans 50 µl de milieu. Les échantillons ont été incubés 15 à 20 min. avant d'être déposés goutte-à-goutte sur les cellules.

#### 2.6.5. Analyse par cytométrie en flux

Pour vérifier l'expression de la hrGFP (Stratagene) ou de la DsRed2 (BD Biosciences-Clontech, Mississauga, Canada) par les cellules transfectées, une analyse au cytomètre Epics XL (Beckman-Coulter) a été effectuée. Au total,  $5 \times 10^5$  cellules lavées avec du PBS ont été utilisées par analyse. Un laser d'argon à 488 nm a permis de collecter le signal fluorescent de la hrGFP en FL1 (525 nm) alors que le signal fluorescent de la DsRed2 a été obtenu en FL2 (575 nm). Afin de sélectionner et d'amplifier les cellules exprimant la hrGFP, un tri cellulaire a été effectué avec un cytomètre Elite (Beckman-Coulter). Au total,  $10 \times 10^7$  cellules resuspendues de manière à disperser les agrégats ont été triées en présence de 1 µg/ml d'iodure de propidium pour distinguer les cellules mortes des vivantes. Les cellules ont été récupérées dans un milieu de culture contenant 2 % de pénicilline et streptomycine et l'antibiotique de sélection a été ajouté.

#### 2.6.6. Microscopie à fluorescence

Des cellules adhérentes ont été transférées dans une plaque de 24 puits contenant une lamelle circulaire. Elles ont été incubées pendant 16 à 18 heures à 37°C avant d'être lavées avec du PBS et fixées avec 200 µl d'une solution de PBS contenant 4 % de paraformaldéhyde. Les cellules ont été incubées 10 min. à la température ambiante dans le noir avant d'être lavées une fois avec 500 µl de PBS. Les lamelles ont été déposées à l'envers sur une lame avec une goutte de solution de montage Geltol contenant 2.5 % DABCO et 500 ng/ml de DAPI (Thermo-Immunon, Pittsburgh, PA). Les lames ont été séchées une heure à la température ambiante avant d'être observées au microscope à fluorescence.

#### 2.6.7. Stimulation cellulaire

Pour les stimulations cellulaires,  $10^6$  cellules ont été placées dans un puit contenant 2 ml de milieu complet approprié. L'activation a été effectuée avec 0.125 µM de Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Calbiochem) et 1 µg/ml d'ionomycine (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) suivie d'une incubation de 16 à 18 heures à 37°C. Alternativement, une stimulation par le CD3 et le CD28 a été effectuée. L'anti-CD3 humain (Clone UCHT1; eBioscience, San Diego, CA) dilué à 10 µg/ml dans du tampon Tris 0.05 M à pH 9.3 a été ajouté aux puits pendant 16 à 18 heures à 4°C pour l'adsorption. Les puits ont été lavés une fois avec du PBS puis bloqués avec du PBS contenant 10 % de SVF. Après un lavage avec du PBS, les cellules ont été transférées dans les puits. L'anticorps anti-CD28 humain (Clone CD28.2; eBioscience) a été ajouté en même temps qu'un anticorps anti-IgG murin (Biosource, Camarillo, CA) dans un rapport 1 :1 (1 µg/ml). Une incubation de 6 à 24 heures a été effectuée pour stimuler les cellules.

#### 2.6.8. Suivi cellulaire après injection *in vivo*

Afin d'évaluer la survie *in vivo*,  $10 \times 10^6$  cellules transfectées avec la hrGFP ont été injectées par i.v. dans des souris receveuses (gracieuseté du Dr. Claude Daniel) et des prélèvements d'organes ont été effectués sur une période variant de 1 à 48 heures. Les rates, ganglions mésentériques, le foie et les poumons ont été prélevés puis broyés entre

deux lames afin de libérer les cellules. Le sang a été récupéré dans un tube contenant un tampon anti-coagulant. Les globules blancs ont été isolés et les globules rouges ont été éliminés avec un tampon de lyse érythrocytaire. Les agrégats ont été défaits par une série de lavages avec du milieu de culture suivis de centrifugations de 5 min à 380 x g. Les culots obtenus de moins de  $10^6$  cellules ont été resuspendus dans 500  $\mu$ l de PBS avant d'être analysés au cytomètre.

## 2.7. Analyse protéique

### 2.7.1. Essais luciférase

Les essais luciférase ont été effectués en co-transfectant de manière transitoire dans un rapport 1 :1 un vecteur exprimant la luciférase avec le vecteur pCMV $\beta$ -Gal (Promega, Madison, WI) servant de contrôle interne pour l'efficacité de transfection. Les cellules ont été incubées pendant 24 à 48 heures, centrifugées 5 min à 500 x g puis resuspendues dans 100  $\mu$ l de tampon de lyse (Promega). Après une incubation de 10 min. à  $-80^{\circ}\text{C}$ , elles ont été dégelées 15 min. à la température ambiante. Le surnageant a été récupéré par centrifugation de 2 min. à 21,000 x g. La détection de la  $\beta$ -galactosidase a été effectuée en plaque de 96 puits en plaçant 30  $\mu$ l de tampon de lyse, 20  $\mu$ l du surnageant et 50  $\mu$ l du tampon  $\beta$ -Gal 2X. La plaque a été placée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 30 min. puis les réactions ont été arrêtées par ajout de 150  $\mu$ l de solution 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . L'absorbance a été mesurée sur un lecteur de plaque ELISA à 405 nm (Bio-Tek instruments, Winooski, VT). La détection de luciférase a été réalisée dans des tubes en verre en ajoutant à 20  $\mu$ l de surnageant, 50  $\mu$ l du substrat luciférine (Promega). L'intensité lumineuse mesurée par seconde a été détectée avec un luminomètre (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN). Afin de comparer les différents échantillons entre eux, le rapport de l'intensité lumineuse sur la densité optique obtenue pour la détection de la  $\beta$ -galactosidase a été effectué.

### 2.7.2. Test ELISA

Des trousseaux ELISA servant à détecter l'IL-2 murine (eBioscience) et l'IL-10 humaine (BioLegend, San Diego, CA) ont été utilisées. Les plaques de 96 puits ont été incubées pendant 16 à 18 heures à  $4^{\circ}\text{C}$  avec un anticorps de capture pré-titré et dilué

selon les recommandations du fabricant. Après 3 à 4 lavages, les puits ont été bloqués avec la solution de blocage pendant 1 heure à la température ambiante. Les échantillons et le standard dilué ont été ajoutés aux puits et après 2 heures, l'anticorps de détection pré-titré dilué a été ajouté. Après 1 heure à température ambiante, une solution Avidine-HRP a été ajoutée suivi d'une incubation de 30 min. à la noirceur puis de 30 min. avec le substrat TMB. Après addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N aux puits, l'absorbance a été mesurée sur un lecteur de plaque ELISA à 450 nm. La valeur de sensibilité établie était de 2 pg/ml et de 2.4 pg/ml pour les trousse d'IL-2 murine et d'IL-10 humaine, respectivement.

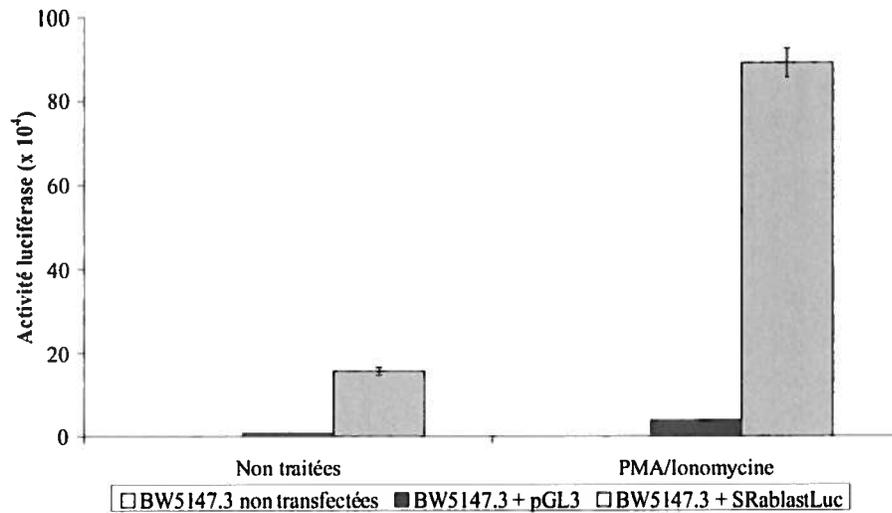
### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. Construction de vecteurs SR $\alpha$

Pour générer des cellules régulatrices T artificielles, un récepteur chimérique et des cytokines immunosuppressives doivent être exprimés par une même cellule. Plusieurs gènes nécessitent donc d'être transfectés en combinaison avec un gène rapporteur tel la luciférase. Une famille de vecteurs qui utilisent le promoteur SR $\alpha$  a été construite. Les vecteurs SR $\alpha$ puroMCS1, SR $\alpha$ neoMCS1, SR $\alpha$ hygroMCS1 et SR $\alpha$ blastMCS1 permettent une sélection par différents agents. Les détails de clonage sont montrés dans l'article présenté en annexe.

##### 3.1.1. Fonctionnalité du promoteur SR $\alpha$

La fonctionnalité du promoteur SR $\alpha$  a été évaluée avec des essais luciférase et comparée au vecteur pGL3 (Promega) sous le contrôle du promoteur précoce de SV40. La luciférase provenant de *Photinus pyralis* clonée dans le vecteur pGL3 a été excisée avec *AvrII/HpaI* et clonée dans les sites *SpeI/SnaBI* de pSR $\alpha$ blastMCS1. Les deux vecteurs ont été transfectés de manière transitoire par électroporation dans les cellules BW5147.3. Ces dernières ont été incubées 24 heures avant d'être stimulées avec PMA et ionomycine pendant un autre 24 heures. L'intensité lumineuse émise par l'ajout de substrat luciférine a été mesurée au luminomètre. Le taux de transfection a été normalisé par co-transfection avec le vecteur pCMV $\beta$ -Gal et la détection de la  $\beta$ -galactosidase. La figure 11 montre que le vecteur SR $\alpha$ blastLuc possède une activité constitutive 20 fois plus importante que le vecteur pGL3. De plus, elle augmente fortement suite à l'activation (environ 6 fois la valeur obtenue pour les cellules non traitées). Puisque le promoteur SR $\alpha$  est composé d'une fusion entre le promoteur précoce de SV40 et la région R-U5' de HTLV-1, ceci démontre que la présence du stabilisateur traductionnel de HTLV-1 augmente fortement l'expression protéique par rapport au SV40 seul.



**Figure 11. Expression de la luciférase avec le vecteur rapporteur SRblastLuc.** L'activité luciférase mesurée 48 heures après la transfection transitoire par électroporation des cellules BW5147.3 avec le vecteur pGL3 servant de témoin positif (en noir) ou SRblastLuc (en gris) a été normalisée sur l'activité  $\beta$ -galactosidase. Après 24 heures d'incubation, du PMA et de l'ionomycine ont été ajoutés pour être comparé aux cellules non traitées. Des cellules BW5147.3 non-transfectées (en blanc) ont servi de témoin négatif.

### 3.2. Construction de vecteurs multi-cistronique

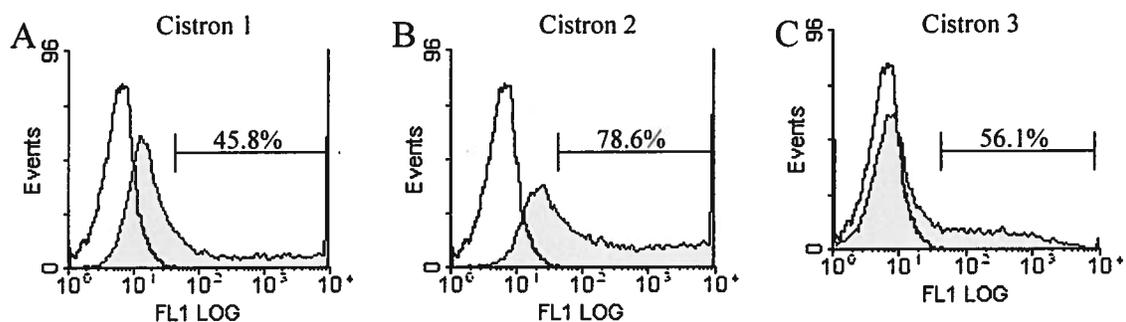
Afin de limiter le nombre de constructions à transférer dans une même cellule, une famille de vecteurs tri-cistronique, dérivée de la famille SR $\alpha$ , a été construite en y introduisant des séquences IRES. Les détails de clonage sont présentés dans l'article en annexe. Chaque vecteur est constitué de trois MCS séparés par deux IRES et un fluorochrome distinct a été placé dans le dernier cistron. Les vecteurs SR $\alpha$ puroG, SR $\alpha$ neoR, SR $\alpha$ hygroY et SR $\alpha$ blastC peuvent être sélectionnés individuellement et permettent l'expression de 2 gènes chacuns. En utilisant les 4 vecteurs, 8 protéines différentes peuvent être co-exprimées dans une seule cellule et triées en fonction de l'expression des fluorochromes individuels. Dans le but de mimer les cellules T régulatrices, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  devront être co-exprimés donc l'utilisation d'un vecteur multi-cistronique est indiquée.

Un vecteur à trois cistrons contenant deux IRES a été créé à partir du vecteur pSR $\alpha$ puroMCS1. Le premier IRES provenant du virus de l'encéphalomyocardite (ECMV) cloné dans le vecteur pIRES (Clontech Laboratories) a été obtenu par digestion

*MluI/SmaI* et introduit dans le MCS de pSR $\alpha$ puroMCS1 digéré avec *MluI/PvuII*. Le second IRES a été obtenu par amplification par PCR de pIRES avec les amorces 5'IRES et 3'IRES (Tableau IV). Le fragment de PCR a été digéré avec *AgeI/XbaI* et inséré dans les mêmes sites de pSR $\alpha$ puroMCS1 contenant le premier IRES. La fonctionnalité de cette construction a été vérifiée en analysant l'expression individuelle dans chacun des cistrons puis en vérifiant la co-expression de deux protéines.

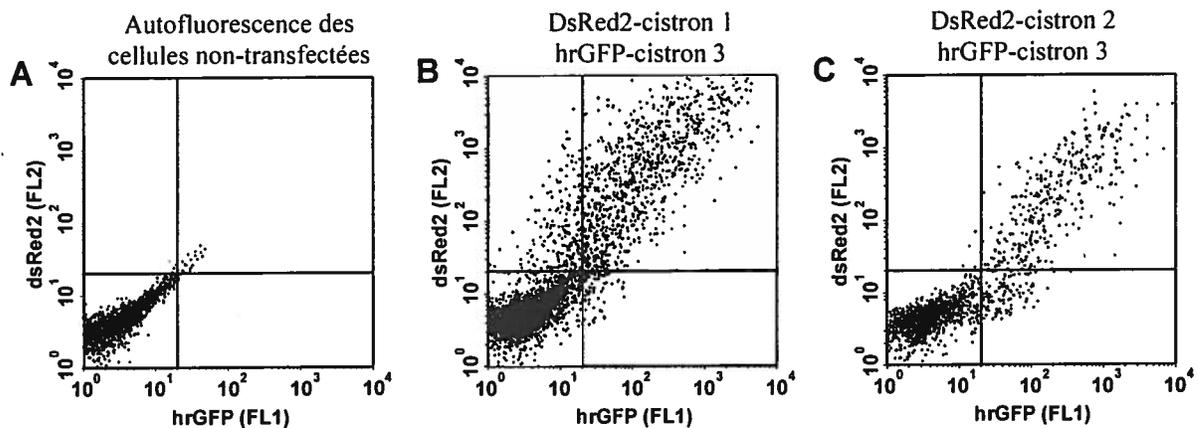
### 3.2.1. Validation du vecteur tri-cistronique

La hrGFP provenant de *Renilla reniformis* présente dans une construction disponible au laboratoire nommée pcDNA3.1zeo-hrGFP a été clonée dans chacun des cistrons du vecteur SR $\alpha$ puroIRES2 contenant les deux IRES. Le vecteur pcDNA3.1zeo-hrGFP a été digéré avec *NheI/SacI* pour exciser la hrGFP qui a été insérée dans le premier cistron de pSR $\alpha$ puroIRES2 digéré *SpeI/SacI*. La hrGFP a aussi été excisée par digestion *NheI*, les extrémités ont été polies avec l'ADN polymérase de T4 (T4Pol), digérées avec *BspEI*, puis insérée dans le second cistron de pSR $\alpha$ puroIRES2 digéré *NdeI/T4Pol/BspEI*. Finalement, la hrGFP a été excisée avec *NheI/BglIII* et clonée dans le troisième cistron de pSR $\alpha$ puroIRES2 digéré avec *NheI/BglIII*. Ces trois constructions ont été transfectées de manière transitoire avec du PEI dans la lignée 293T-17 et analysées au FACS. La figure 12 montre une forte expression dans les deux premiers cistrons, particulièrement dans le second (en gris) par rapport aux cellules 293T non-transfectées (ligne noire), alors que le dernier cistron montre une plus faible expression.



**Figure 12. Analyse au FACS de hrGFP dans chacun des cistrons.** La hrGFP a été clonée séparément dans les trois cistrons du vecteur tri-cistronique pSR $\alpha$ puroIRES2 (A,B,C). Chacun de ces vecteurs a ensuite été transfecté de manière transitoire avec du PEI dans des cellules 293T-17 puis l'expression de la hrGFP a été analysée après 48 heures d'incubation au FACS. Des cellules 293T-17 non-transfectées (ligne noire) ont été utilisées comme témoin négatif.

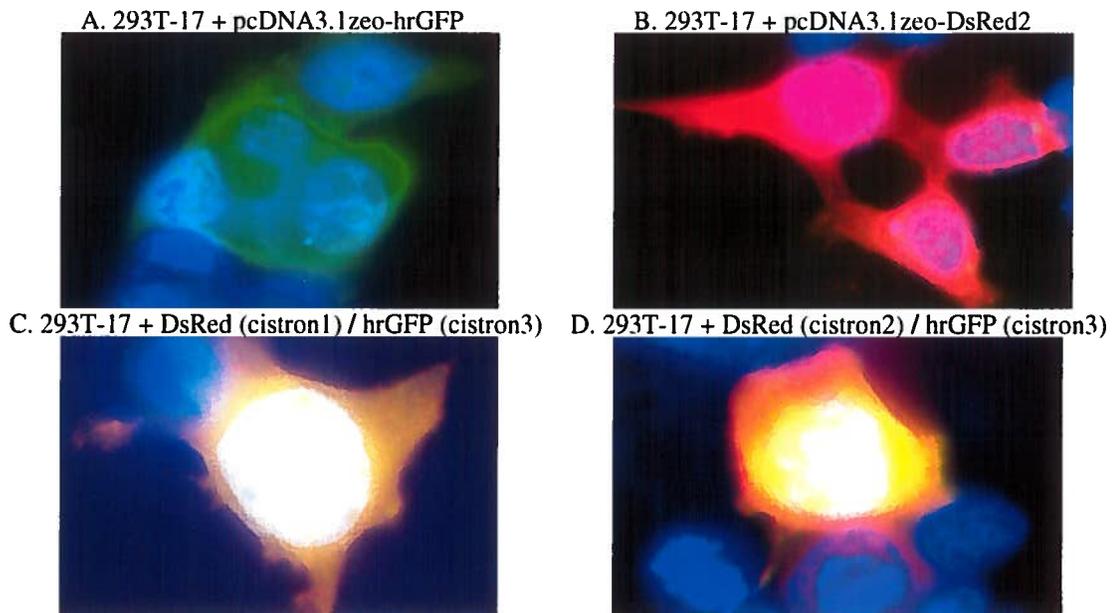
Afin de confirmer la co-expression de protéines, la DsRed2 (Clontech Laboratories), une protéine fluorescente rouge provenant de *Discosoma sp.* possédant des propriétés spectrales différentes de la hrGFP a été utilisée. Comme le cytomètre ne permet pas de discriminer trois fluorochromes différents placés dans chacun des cistrons, seuls deux fluorochromes ont été utilisés. Deux constructions ont été réalisées dans pSR $\alpha$ puroIRES2, la première avec la DsRed2 dans le premier cistron et la hrGFP dans le troisième, et la seconde avec la DsRed2 dans le deuxième cistron et la hrGFP dans le dernier cistron. La première construction a été effectuée en insérant la DsRed2 du vecteur pDsRed2 (Clontech Laboratories) digéré *NotI/T4Pol/XbaI* dans le premier cistron de pSR $\alpha$ puroIRES2 contenant la hrGFP dans le dernier cistron digéré avec *SpeI/NruI*. La seconde construction a été réalisée par l'insertion de la DsRed2 issue de pcDNA3.1zeo-DsRed2 digéré avec *AgeI/EcoRV* et cloné dans le second cistron de pSR $\alpha$ puroIRES2 digéré avec *BspEI/SnaBI*. Le vecteur pcDNA3.1zeo-hrGFP a été digéré avec *NheI/EcoRI*, puis la hrGFP a été clonée dans le dernier cistron du vecteur contenant la DsRed2 dans le second cistron et digéré avec *NheI/MfeI*. Ces deux constructions ont été transfectées individuellement de manière transitoire avec le Fugène dans la lignée 293T-17, puis analysées au FACS et en microscopie à fluorescence.



**Figure 13. Analyse par FACS de co-expression de hrGFP et DsRed2.** La hrGFP a été clonée dans le troisième cistron du vecteur pSR $\alpha$ puroIRES2 en combinaison avec la DsRed2 clonée soit dans le premier cistron (B) ou dans le deuxième cistron (C). Ces vecteurs ont été transfectés de manière transitoire avec le Fugène dans des cellules 293T-17 puis la co-expression été analysée après 48 heures d'incubation au FACS. Des cellules 293T-17 non-transfectées (A) ont été utilisées comme témoins négatifs.

Les résultats de la figure 13 montrent que 17.4% des cellules analysées co-expriment la DsRed2 et la hrGFP lorsque le premier fluorochrome se trouve dans le premier cistron

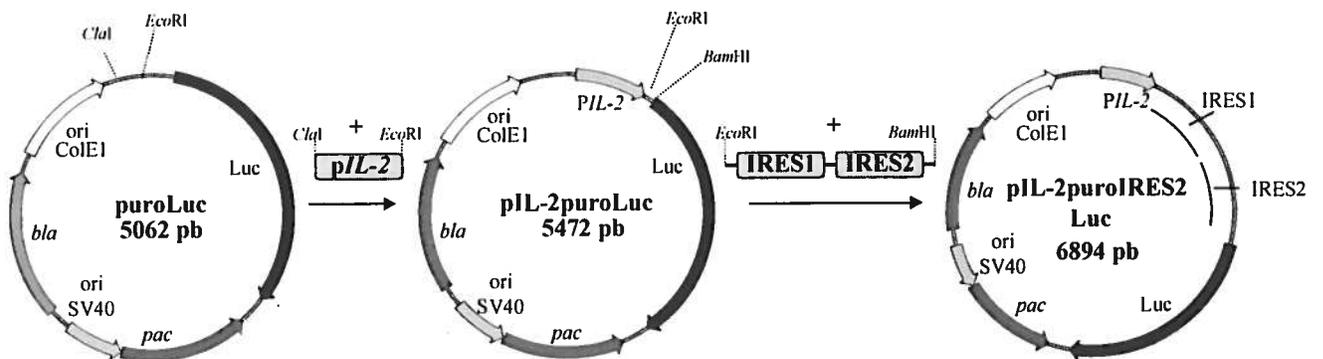
et la hrGFP dans le dernier cistron. De même, 19.8% de cellules co-expriment les deux fluorochromes avec la DsRed2 dans le second cistron et la hrGFP dans le troisième cistron. Dans chaque cas, il existe une corrélation linéaire entre le niveau de fluorescence détectée pour la hrGFP et la DsRed2 qui peut être expliquée par les propriétés spectrales de la DsRed2. Bien que la longueur d'onde d'excitation utilisée (488 nm) est maximale pour la hrGFP, elle est efficace à seulement 10% avec la DsRed2. La détection de la hrGFP dans le dernier cistron assure ainsi que des cellules ayant une forte expression au niveau du premier ou deuxième cistron puissent être obtenues. L'analyse par microscopie à fluorescence présentée à la figure 14 confirme ces résultats. Des cellules 293T-17 transfectées avec le vecteur pcDNA3.1zeo-hrGFP (Figure 14A) ou le vecteur pcDNA3.1zeo-DsRed2 (Figure 14B) ont servi de témoins positifs et se visualisent respectivement au microscope par une couleur verte ou rouge. Suite à la co-expression des deux protéines, une couleur orangée devient apparente (Figure 14C et 14D). Les noyaux en bleu montrent des cellules 293T-17 non-transfectées ayant servi de témoin négatif (coloration au DAPI).



**Figure 14. Analyse par microscopie à fluorescence de co-expression de hrGFP et de DsRed2.** La hrGFP a été clonée dans le troisième cistron du vecteur pSR $\alpha$ puroIRES2 en combinaison avec la DsRed2 clonée soit dans le premier cistron (C) ou dans le deuxième cistron (D). Ces vecteurs ont été transfectés de manière transitoire avec le Fugène dans des cellules 293T-17 puis la co-expression a été analysée après 24 heures d'incubation par microscopie à fluorescence. Des cellules 293T-17 transfectées avec le vecteur pcDNA3.1zeo-hrGFP (A) ou pcDNA3.1zeoDsRed2 (B) ont été utilisées comme témoin positif.

### 3.3. Clonage d'un promoteur inducible

Le vecteur tri-cistronique étant fonctionnel, le promoteur constitutif SR $\alpha$  a été remplacé par le promoteur d'IL-2 qui est inducible suite à l'engagement des récepteurs T artificiels. Le promoteur d'IL-2 a été obtenu par PCR sur l'ADN génomique de cellules Jurkat 77.6 grâce aux amorces 5'PIL-2 et 3'PIL-2 (Tableau IV). Comme il était plus simple d'introduire le promoteur de l'IL-2 dans le vecteur sans IRES, le clonage a d'abord été effectué dans un vecteur pSR $\alpha$ puroMCS1 dont le promoteur SR $\alpha$  avait été délété. Pour vérifier l'inductibilité du promoteur, des essais luciférase nécessitaient le clonage du gène rapporteur. La luciférase du vecteur pGL3 a été excisée par digestion avec *AvrII/HpaI* et clonée dans le vecteur puroMCS1 digéré avec *SpeI/NaeI*. Le produit de PCR contenant le promoteur de l'IL-2 a été digéré avec *Clal/EcoRI* et introduit dans les mêmes sites du vecteur puroLuc pour donner pIL-2puroLuc (Figure 15).

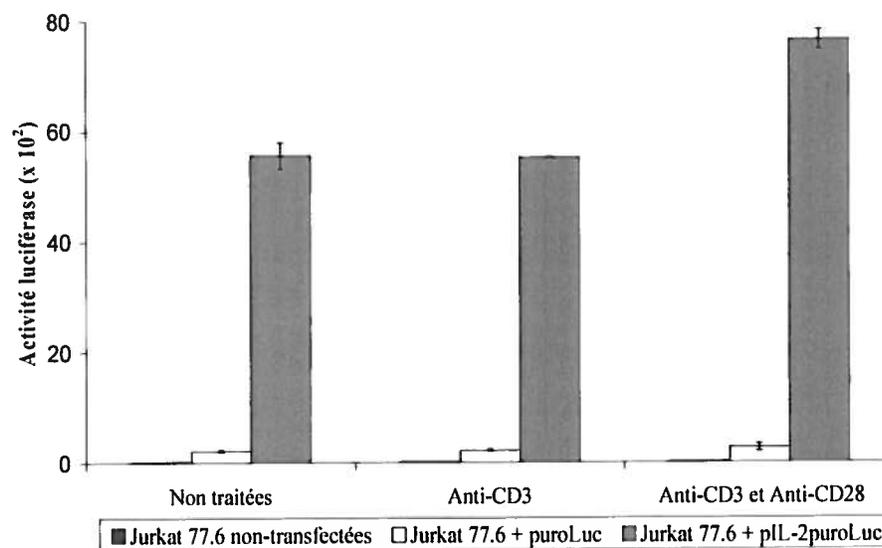


**Figure 15. Construction de vecteurs possédant le promoteur inducible de l'IL-2.**

#### 3.3.1. Inductibilité du promoteur

L'inductibilité du promoteur de l'IL-2 a été évaluée avec des essais luciférase. Des cellules Jurkat 77.6 ont été transfectées de manière transitoire avec puroLuc et pIL-2puroLuc, puis ont été stimulées ou non 24 heures plus tard avec un anti-CD3 ou un anti-CD3 et un anti-CD28. Après 24 heures d'incubation, l'activité luciférase a été mesurée au luminomètre et normalisée sur l'activité  $\beta$ -galactosidase. Les cellules Jurkat 77.6 transfectées avec le vecteur pGL3 ont servi de témoin positif (résultats non-présentés). La figure 16 montre que les taux de luciférase détectés pour la construction puroLuc sont

peu variables mais non nuls entre les cellules non stimulées et les cellules stimulées avec un anti-CD3 seul ou combiné à l'anti-CD28. Le promoteur d'IL-2 montre une activité beaucoup plus importante que les cellules non-transfectées ou transfectées avec le vecteur sans promoteur, mais possède une activité basale élevée chez des cellules non stimulées qui est comparable aux cellules stimulées avec l'anti-CD3. De plus, la co-stimulation par le CD28 induit l'induction maximale du promoteur de l'IL-2. Ayant démontré l'inductibilité du promoteur, la cassette à deux IRES a été introduite dans le vecteur pIL-2puroLuc par digestion avec *Bam*HI/*Eco*RI (Figure 15).

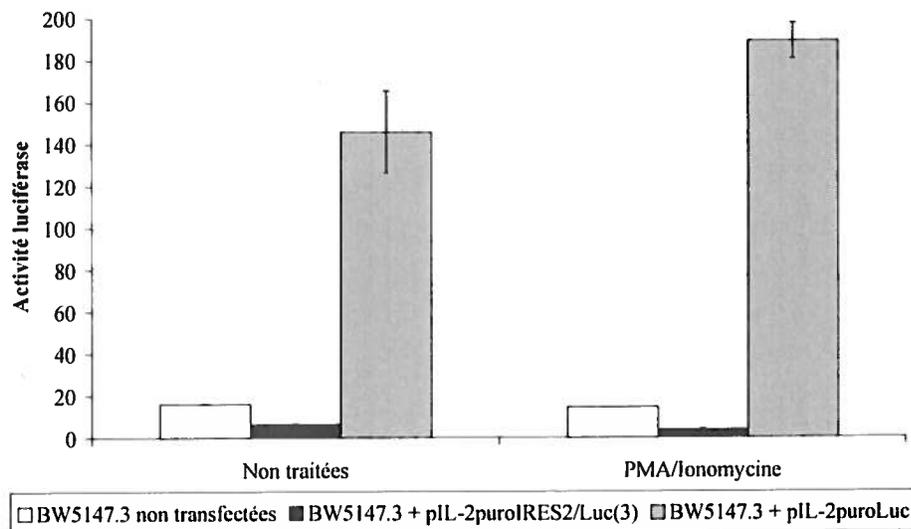


**Figure 16. Expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur de l'IL-2.** L'activité luciférase mesurée 48 heures après la transfection transitoire par électroporation des cellules Jurkat 77.6 avec le vecteur puroLuc (en blanc) ou pIL-2puroLuc (en gris) a été normalisée sur l'activité  $\beta$ -galactosidase. Après 24 heures d'incubation, un anti-CD3 seul ou en combinaison avec un anti-CD28 a été ajouté pour être comparé aux cellules non traitées. Des cellules Jurkat 77.6 non-transfectées (en noir) ont servi de témoins négatifs.

### 3.3.2. Expression contrôlée

Les cellules murines BW5147.3 expriment des CMH-I d'haplotype k comme les souris receveuses dans le modèle murin de rejet d'allogreffe. Elles ont été choisies pour cette raison afin de minimiser leur rejet *in vivo* une fois introduites chez la souris. L'expression de la luciférase placée sous le contrôle du promoteur de l'IL-2 a été vérifiée chez les cellules BW5147.3 transfectées de manière transitoire par électroporation avec pIL-2puroLuc et pIL-2puroIRES2Luc. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été

stimulées ou non avec PMA et ionomycine avant d'être incubées pendant 24 heures et analysées au luminomètre. La figure 17 montre les taux obtenus pour les différentes conditions analysées. Des cellules BW5147.3 transfectées avec le vecteur pGL3 ont été utilisées comme témoins positifs (résultats non-présentés). En comparant avec des cellules non-transfectées, l'ajout de pIL-2puroLuc permet la détection d'une activité luciférase élevée même chez les cellules non activées confirmant les résultats obtenus avec les cellules Jurkat77.6. En plus de cette activité basale, le promoteur de l'IL-2 est, chez les cellules BW5147.3, sensible à une co-stimulation apportée par le CD28. Cependant, il n'est pas possible de détecter la luciférase lorsqu'elle est placée dans le dernier cistron du vecteur tri-cistronique tant chez les cellules non-activées que chez les cellules activées. L'utilisation du vecteur rapporteur SR $\alpha$ blastLuc en parallèle serait plus appropriée pour effectuer le suivi *in vivo*.



**Figure 17. Expression contrôlée de la luciférase par les cellules BW5147.3.** L'activité luciférase mesurée 48 heures après la transfection transitoire par électroporation des cellules BW5147.3 avec le vecteur pIL-2puroIRES2/Luc(3) (en noir) ou pIL-2puroLuc (en gris) a été normalisée sur l'activité  $\beta$ -galactosidase. Après 24 heures d'incubation, du PMA et de l'ionomycine ont été ajoutés pour être comparé aux cellules non traitées. Des cellules BW5147.3 non-transfectées (en blanc) ont servi de témoins négatifs.

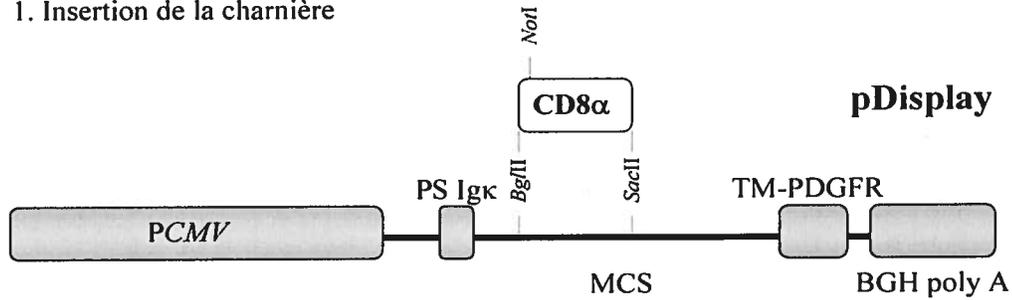
### 3.4. Assemblage des récepteurs T artificiels

L'assemblage de deux types de récepteurs T artificiels, avec ou sans le CD28, a été effectué dans le vecteur pDisplay. L'unité de signalisation a d'abord été formée après quoi, le scFv B8-24-3 qui reconnaît les CMH-I D<sup>p</sup>, K<sup>b</sup> et K<sup>p</sup> a été introduit. La figure 18

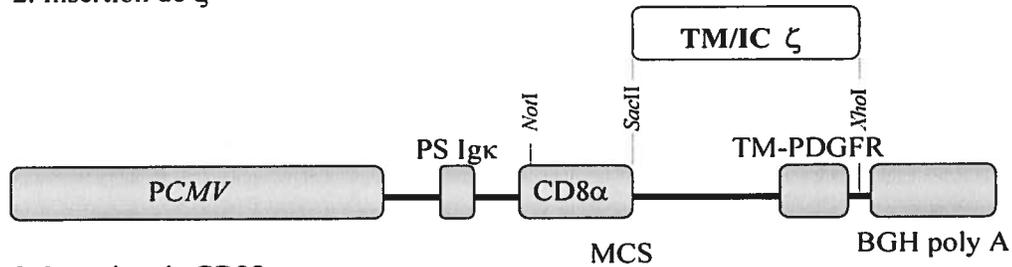
résume les clonages réalisés pour obtenir l'unité de signalisation. C'est la portion constante  $\alpha$  du CD8 murin qui a été utilisée comme charnière flexible. Cette construction a été obtenue par amplification de l'ADNc du CD8 $\alpha$  par RT-PCR sur de l'ARN de PBMC de souris. Les amorces utilisées présentaient en 5' un site de *Bgl*III et un site *Sac*II en 3' (5' CD8 $\alpha$  et 3'CD8 $\alpha$ , Tableau IV). L'insertion de ce fragment de 216 pb a été effectuée dans les mêmes sites de pDisplay.

Comme l'utilisation de CD3  $\zeta$  est efficace pour obtenir des récepteurs T artificiels fonctionnels [83, 84, 85], la portion intracellulaire de cette molécule a été fusionnée à CD8 $\alpha$ . Dans le premier type de récepteur T artificiel, l'ancrage de la chimère à la surface de la cellule est assuré par le domaine transmembranaire du CD3  $\zeta$  (Figure 18-2). L'ADNc de CD3  $\zeta$  a été amplifié par RT-PCR sur l'ARN de PBMC de souris avec les amorces 5'mZeta et 3'mZeta (Tableau IV), digéré avec *Sac*II et *Xho*I puis cloné dans le vecteur pDisplay contenant le CD8 $\alpha$  digéré avec *Sac*II/*Xho*I. Afin d'étudier l'effet de la co-stimulation, un second récepteur T artificiel contenant la portion intracellulaire du CD28 a été généré (Figure 18-3). La portion amplifiée de cette molécule contenait son propre domaine transmembranaire afin de remplacer celui de la chaîne zeta de la première construction. La proximité du CD28 à la membrane est nécessaire pour que les fonctions effectrices des lymphocytes soient augmentées [89, 92]. Un PCR a été effectué sur le récepteur sans molécule de co-stimulation avec les amorces 5'IcmZeta et BGHr (Tableau IV) afin d'introduire un site *Xba*I à l'intérieur de la portion transmembranaire du zeta. Le fragment d'environ 450 pb a été digéré avec *Sac*II/*Xho*I puis reclone dans le vecteur d'origine dans les mêmes sites. Les portions transmembranaires et intracellulaires du CD28 ont été obtenues par RT-PCR sur l'ARN de PBMC humains avec les amorces 5'CD28h et 3'CD28h (Tableau IV). Le fragment obtenu de 207 pb a été digéré avec les enzymes *Sac*II/*Xba*I puis cloné dans le vecteur pDisplay contenant la chaîne zeta et le site *Xba*I digéré avec *Sac*II. À chaque étape, les clones recombinants ont été identifiés par digestion enzymatique, puis les vecteurs ont été séquencés afin de s'assurer qu'aucune mutation n'avait été introduite dans les fragments amplifiés et que les différents domaines étaient dans le même cadre de lecture.

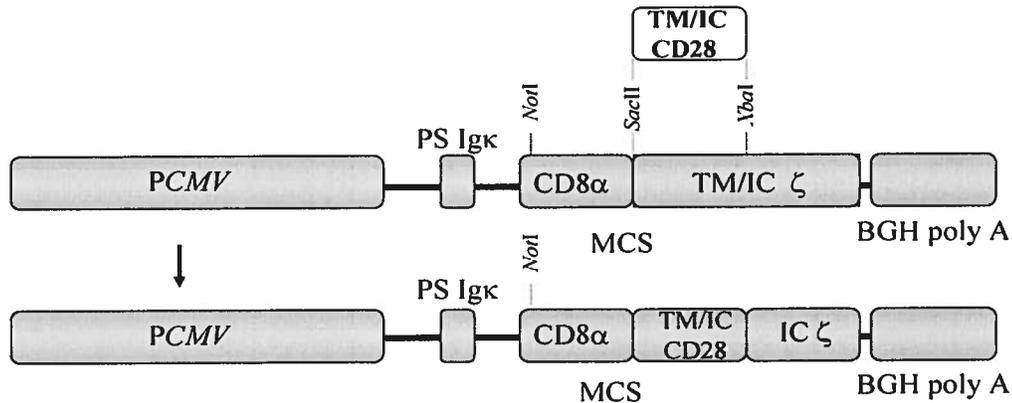
1. Insertion de la charnière



2. Insertion de  $\zeta$



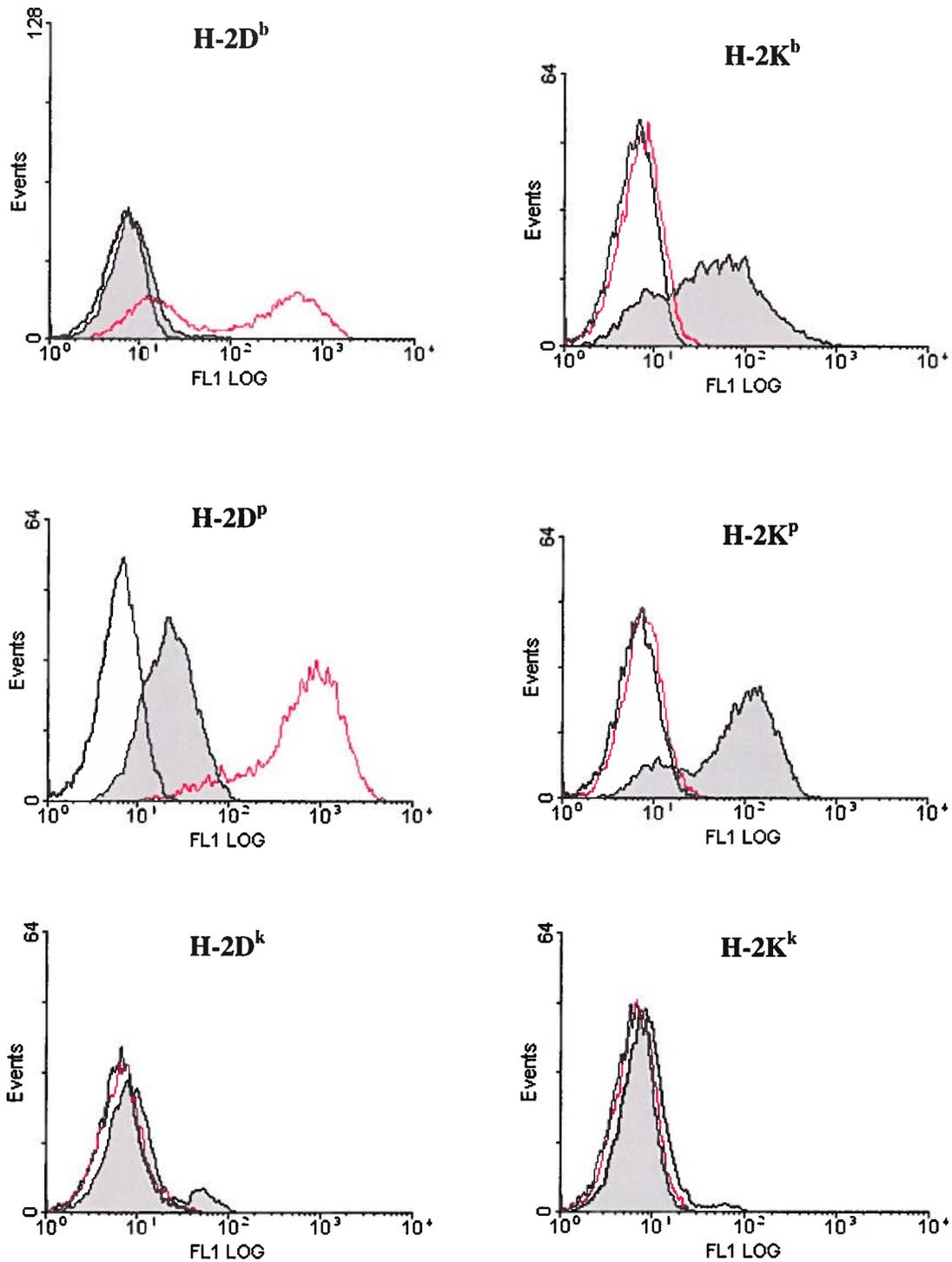
3. Insertion de CD28



**Figure 18. Assemblage des unités de signalisation dans pDisplay.**

3.4.1. Spécificité des anticorps

Comme l'anticorps B8-24-3 (ATCC, #TIB-139), l'anticorps de rat K204 (ATCC, #HB-221) reconnaît uniquement les CMH-I d'haplotypes b et p. Une comparaison entre les deux était alors nécessaire pour sélectionner l'anticorps optimal. Des populations de cellules HeLa transfectées avec les CMH-I ont été marquées individuellement avec ces deux anticorps. Pour K204, l'anticorps secondaire anti-IgG de rat conjugué au FITC a été utilisé alors qu'un anti-IgG de souris a été employé pour B8-24-3. La figure 19 montre le résultat de l'analyse par cytométrie en flux. Ainsi, l'anticorps K204, contrairement à B8-24-3, reconnaît le CMH-I D<sup>b</sup> et reconnaît plus fortement le CMH-I D<sup>p</sup>. Toutefois, K204 possède un éventail de reconnaissance plus restreint que B8-24-3 puisqu'il ne reconnaît

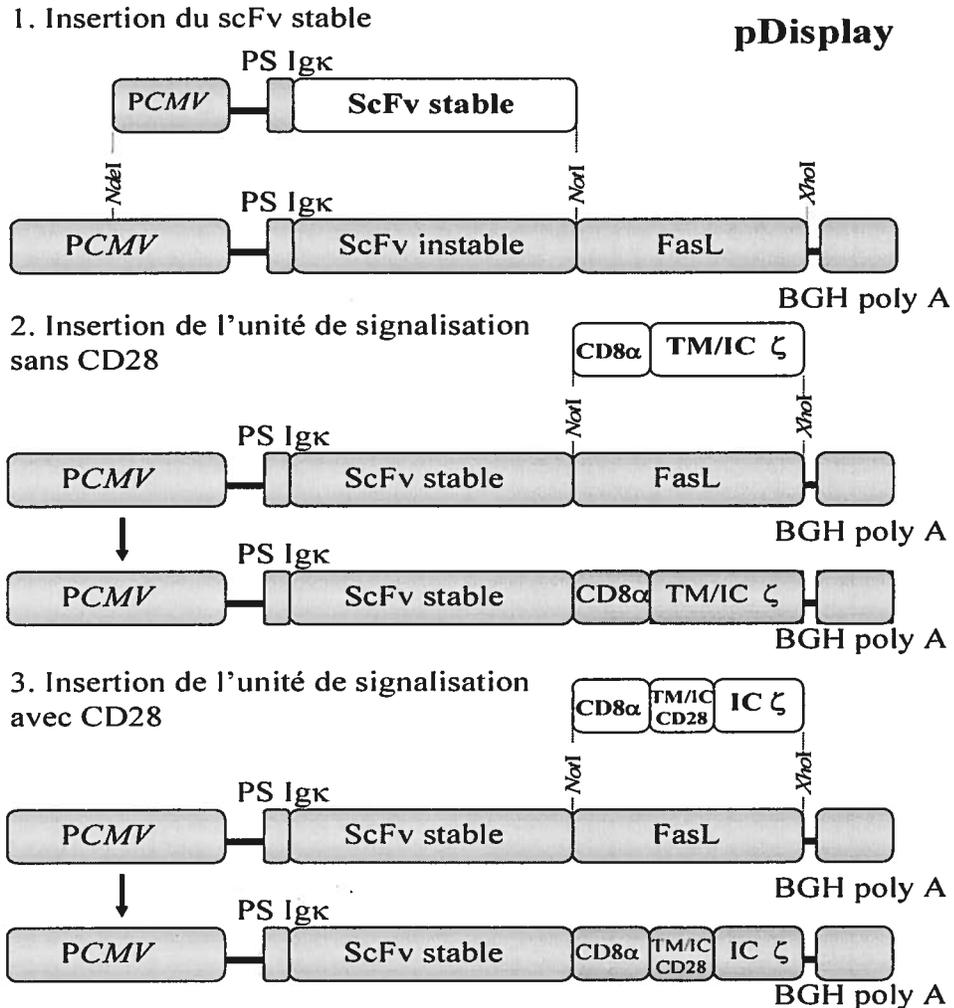


**Figure 19. Comparaison de la spécificité des anticorps B8-24-3 et K204 par FACS.** Des cellules HeLa transfectées avec les CMH-I D<sup>b</sup>, D<sup>p</sup>, D<sup>k</sup>, K<sup>b</sup>, K<sup>p</sup> et K<sup>k</sup> ont été marquées, d'une part (en gris), avec l'anticorps B8-24-3 et un anti-souris IgG conjugué au FITC ou d'autre part (en rouge), avec l'anticorps K204 et un anti-rat IgG conjugué au FITC. Les marquages ont été visualisés par cytométrie en flux. Pour chacune des populations analysées, des cellules non marquées (ligne noire) ont été utilisées comme témoin négatif.

pas les CMH-I K<sup>b</sup> et K<sup>p</sup>. Un scFv généré à partir de K204 aurait pu être employé mais le scFv dérivé de B8-24-3 possède un plus large spectre de reconnaissance. De plus, puisque K204 provient du rat, celui-ci aurait pu causer des réponses immunitaires dans le modèle murin.

#### 3.4.2. Unité de reconnaissance antigénique

Le projet visait à induire la sécrétion de cytokines immunosuppressives uniquement suite à la reconnaissance de molécules de surface présentes sur les greffons. Un scFv formant l'unité de reconnaissance avait été conçu dans le laboratoire du docteur Denis. Ce scFv est formé des portions variables des chaînes lourdes et légères dérivées de l'anticorps produit par l'hybridome B8-24-3 unies par une charnière peptidique ayant le motif (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> [143]. Dans le modèle murin de rejet de greffe utilisé, les souris donneuses expriment les CMH-I D<sup>b</sup>, K<sup>b</sup> ou D<sup>p</sup> et K<sup>p</sup> et les souris receveuses D<sup>k</sup> et K<sup>k</sup> et il a été démontré que l'anticorps parental B8-24-3 reconnaissait les haplotypes b et p, plus précisément H-2D<sup>p</sup>, K<sup>b</sup> et K<sup>p</sup> [143] (Figure 19). Le scFv B8-24-3 avait été amplifié avec des amorces dégénérées. Comme la séquence divergeait du consensus, des modifications ont été introduites afin de rendre le scFv plus stable ce qui se traduisait par une meilleure expression [143]. Le scFv stable a été excisé de sa construction par digestion avec *NdeI/NotI* puis introduit aux mêmes sites dans une variante de pDisplay créée dans le laboratoire (Figure 20-1). Les sites *NdeI/NotI* permettaient le clonage direct dans pDisplay, mais le scFv ne pouvait être prélevé seul. En digérant avec *NdeI*, la moitié du promoteur CMV était aussi excisée. Puisque la construction dans laquelle était insérée le scFv stable possédait aussi le promoteur CMV, son transfert ne posait aucun problème. Le scFv plus stable n'aurait pu être prélevé de sa construction pour être transféré aux vecteurs pDisplay-CD8 $\alpha$ /CD3 $\zeta$  ou pDisplay-CD8 $\alpha$ /CD28/CD3 $\zeta$  puisque des sites *NdeI* étaient aussi présents dans CD8 $\alpha$  et CD3  $\zeta$ . La portion CD8 $\alpha$  fusionnée à CD3  $\zeta$  a ensuite été excisée du vecteur pDisplay avec *NotI/XhoI* (Figure 18-2) et insérée dans le vecteur pDisplay-scFv(stable)FasL aux mêmes sites (Figure 20-2). Le site *NotI* avait été introduit dans le CD8 $\alpha$  lors de son amplification par PCR. La portion CD8 $\alpha$  fusionnée au CD28 et au CD3  $\zeta$  a été clonée de la même manière (Figure 20-3).



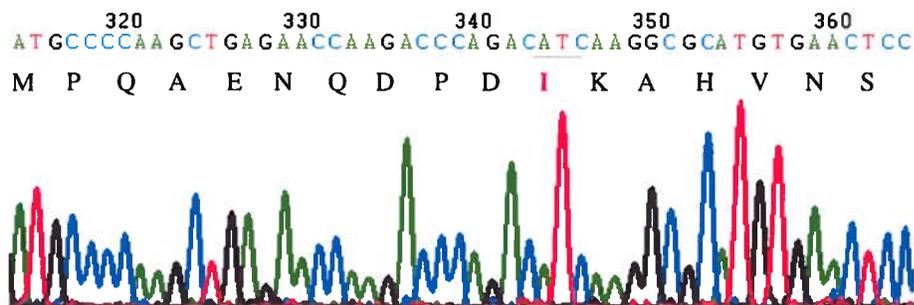
**Figure 20. Assemblage des récepteurs T artificiels dans pDisplay.**

### 3.4.3. Expression des récepteurs T artificiels

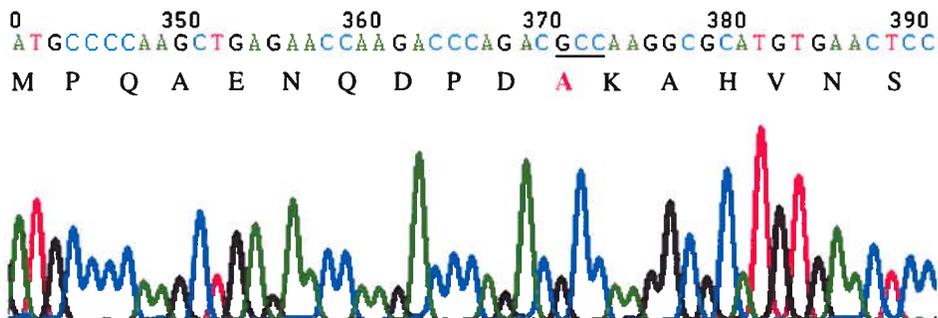
La transfection des deux types de récepteurs T artificiels a été réalisée avec l'agent dreamfect. Après trois semaines de sélection en G-418, un RT-PCR a été effectué sur l'ARN total des populations transfectées. L'amplification a été réalisée avec les amorces 5'S3 et 3'mZeta (Tableau IV) et la figure 21 montre les résultats obtenus. L'amorce 5'S3 se fixe sur la charnière du scFv et 3'mZeta à la fin du CD3ζ. Les résultats obtenus confirment l'expression des deux récepteurs T artificiels chez les populations de cellules BW5147.3 transfectées. L'amplicon du récepteur sans CD28 montre une bande au poids attendu de 1014 pb alors qu'une bande de 1143 pb est obtenue pour le récepteur avec CD28. Des cellules BW5147.3 non-transfectées servaient de témoin négatif et les ADNc

de T4, puis l'ADNc a été inséré dans pCR4Blunt-TOPO et séquencé. Comme les différences d'activité biologique entre l'IL-10v et l'IL-10c dépendent d'un seul acide aminé en position 87, la mutagenèse par PCR a été effectuée pour changer ce résidu. Deux PCR sur l'ADNc de l'IL-10c ont été effectués en parallèle avec les amorces 5'IL-10h et 3'IL-10v (Tableau IV) et les amorces 3'IL-10h et 5'IL-10v (Tableau IV). Après purification, les deux fragments ont été réunis dans un rapport 1 : 1 pour effectuer un PCR avec les amorces 5'IL-10h et 3'IL-10h. Les extrémités saillantes ont été polies avec l'ADN polymérase de T4 et le produit de PCR a été cloné dans pCR4Blunt-Topo pour être séquencé. La figure 22 montre la comparaison des séquences. Dans les portions de chromatogrammes présentées, le changement de l'isoleucine 87 par une alanine est montré. L'IL-10v et l'IL-10c ont été digérés avec *EcoRI/XbaI* et clonés dans le premier cistron du vecteur pIL2puroIRES2Luc digéré avec *EcoRI/SpeI* (Figure 23).

A) IL-10c



B) IL-10v

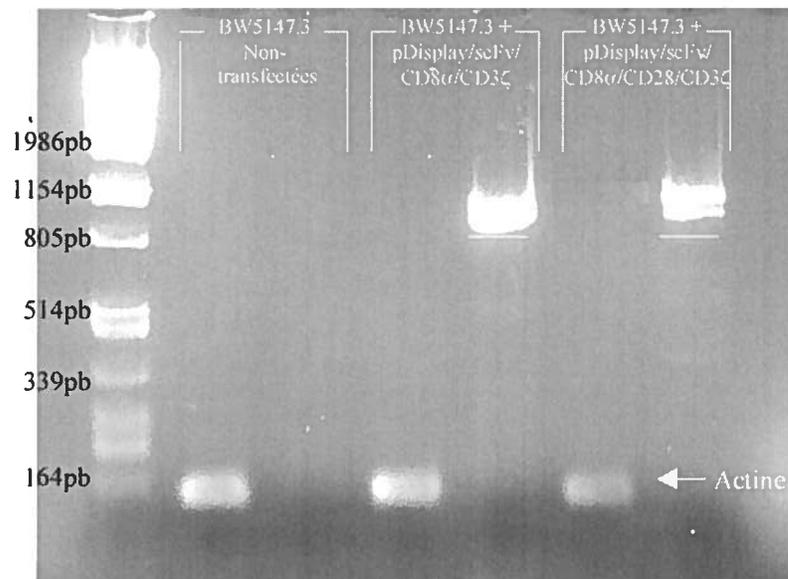


**Figure 22. Construction d'un analogue de l'IL-10c.** Portion d'un chromatogramme montrant le changement d'une isoleucine par une alanine dans la séquence de l'IL-10v. La mutation a été introduite suivant une mutagenèse par PCR.

### 3.5.2. ADNc du TGF- $\beta$

Afin de cloner le TGF- $\beta$  dans le second cistron des constructions réalisées plus haut et rendre le site *BspEI* unique, la luciférase a été éliminée par digestion avec *XbaI* et

ont parallèlement été amplifiés avec les amorces 5'Actine et 3'Actine (Tableau IV) pour normaliser la quantité d'ADNc.



**Figure 21. Analyse par RT-PCR de l'expression des récepteurs T artificiels dans les cellules BW5147.3.** L'amplification a été réalisée avec les amorces 5'S3 et 3'mZeta. Des cellules BW5147.3 non-transfectées ont servi de témoin négatif. L'amplification de l'actine a été effectuée sur l'ARN des trois populations analysées afin de servir de contrôle positif à la transcriptase inverse.

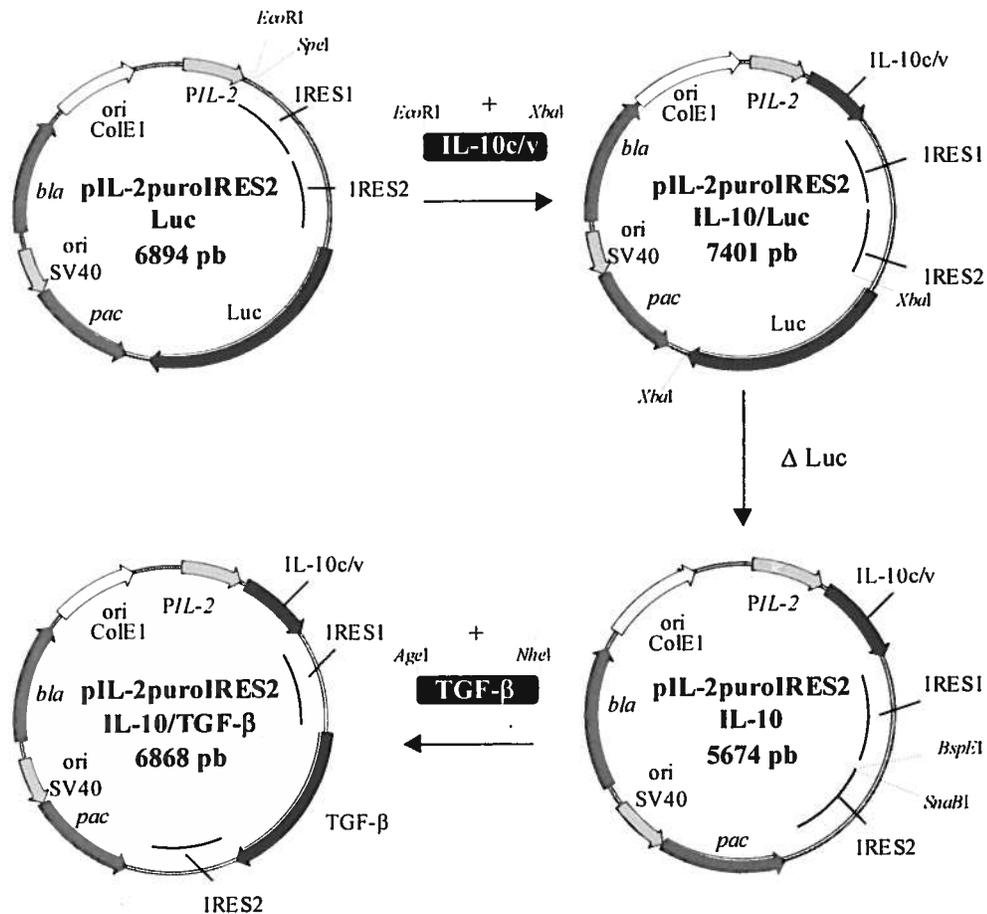
### 3.5. Clonage des cytokines immunosuppressives

C'est dans le vecteur pIL-2puroIRES2Luc qu'ont été introduits les ADNc des cytokines immunosuppressives. Le premier cistron contient l'ADNc de l'IL-10c ou de l'IL-10v alors que le second cistron contient l'ADNc du TGF- $\beta$ . Comme l'expression issue du troisième cistron est trop faible par rapport aux deux premiers, le dernier cistron a été éliminé de la construction pour convertir pIL-2puroIRES2Luc en vecteur bicistronique. Pour faciliter les clonages, l'IL-10 a d'abord été cloné dans le vecteur tricistronique, le troisième cistron a ensuite été éliminé, puis le TGF- $\beta$  a été introduit dans le vecteur bicistronique.

#### 3.5.1. ADNc de l'IL-10c/IL-10v

L'ADNc de l'IL-10c a été obtenu par RT-PCR sur de l'ARN de cellules humaines THP-1 et amplifié à l'aide des amorces 5'IL-10h et 3'IL-10h (Tableau IV). Les extrémités du fragment de PCR de 590 pb obtenu ont été polies avec l'ADN polymérase

ligation intramoléculaire (Figure 23). Le TGF- $\beta$ 1 murin présent dans pORF9-mTGF- $\beta$ 1 (InVivogen, San Diego, CA) a été digéré avec *AgeI/NheI* et cloné dans le second cistron des vecteurs contenant l'IL-10 et digérés avec *BspEI/SnaBI* (Figure 23). Le TGF- $\beta$  activé a été obtenu par mutagenèse par PCR sur pORF-mTGF- $\beta$ 1 avec les amorces distales 5'SR $\alpha$  et 3'SR $\alpha$  (Tableau IV) et les amorces internes 5'TGF- $\beta$ a et 3' TGF- $\beta$ a (Tableau IV).

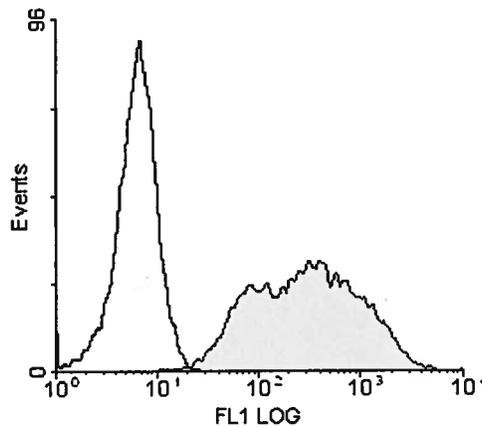


**Figure 23. Génération d'un vecteur bi-cistronique pour l'expression de cytokines.**

### 3.6. Transfections stables et étude *in vivo*

Dans le but de générer des cellules T régulatrices artificielles et de poursuivre les études *in vivo*, des transfectants stables doivent être obtenus. Les cellules BW5147.3 ont été transfectées de manière stable par électroporation avec un vecteur créé dans le laboratoire nommé pcp2-hrGFP qui possède la hrGFP et ont été sélectionnées avec la puromycine. Puisqu'après 3 semaines de sélection, environ 1 % de cellules étaient

positives, un premier tri cellulaire a été effectué. Une population exprimant 100 % de hrGFP a été obtenu après un second tri au FACS. La figure 24 montre (en gris) la fluorescence émise des cellules transfectées avec la hrGFP par rapport aux BW5147.3 non-transfectées (ligne noire). Ces cellules ont été injectées chez des souris receveuses TcR $\alpha$ KOK pour vérifier leur persistance *in vivo*. Les souris TcR $\alpha$ KOK n'expriment pas la chaîne  $\alpha$  du RcT et ne possèdent donc aucune cellule T mais possèdent une population normale de cellules NK. Ces souris ont été choisies pour évaluer la susceptibilité des cellules BW5147.3 à la lyse NK. Les résultats, non présentés, ont démontré un rejet total de ces cellules transfectées malgré le fait que ces cellules expriment les mêmes CMH-I que les souris récipiendaires.



**Figure 24. Fluorescence des cellules BW5147.3 transfectées avec la hrGFP.** Deux tris cellulaires ont été effectués sur les cellules BW5147.3 transfectées avec le vecteur pcp2-hrGFP avant d'être analysées par FACS pour l'expression de la hrGFP.

### 3.6.1. Optimisation des transfections stables

Dans le but de générer des transfectants stables plus rapidement et efficacement que par tri cellulaire, le nucleofector<sup>TM</sup> a été utilisé pour déterminer les conditions optimales. Le tableau V montre les résultats de l'analyse par cytométrie en flux des cellules transfectées de manière stable avec 1 ou 3  $\mu$ g du vecteur pcp2-hrGFP. Huit différents programmes ont été testés et comparés entre eux pour l'efficacité de transfection. La mortalité a été évaluée par ajout de 1  $\mu$ g/ml d'iodure de propidium. Deux témoins négatifs ont été utilisés, l'un contenant l'ADN sans transfection et l'autre, une

transfection sans ADN (résultats non montrés). Les programmes T-16, T-01, G-16 et O-17 donnent les meilleurs taux de transfection mais ne dépassent pas les 15%. Afin de poursuivre les études *in vitro* et *in vivo* pour démontrer le potentiel suppresseur des cellules T régulatrices artificielles, les différentes constructions générées dans le cadre de cette étude devront être transfectées de manière stable par nucleofection en utilisant ces mêmes conditions.

**Tableau V. Analyse par FACS de l'expression stable de la hrGFP par les cellules BW5147.3 transfectées au nucleofactor™.**

Nucleofactor™ Kit V		% Mortalité	% cellules positives	Fluorescence moyenne
Programme	ADN (µg)			
A-23	1	45.6	6.2	186.8
	3	57.9	4.8	184.7
A-27	1	42.8	0.7	209.9
	3	62.6	2.2	179.5
T-20	1	31.9	10.7	150.6
	3	69.4	0.6	182.7
T-27	1	30.8	28.1	128.8
	3	72.8	0.5	64.4
T-16	1	60.9	<b>9.6</b>	<b>255.9</b>
	3	64.0	8.0	162.1
T-01	1	38.4	5.7	156.0
	3	47.2	<b>7.2</b>	<b>293.2</b>
G-16	1	31.8	7.8	214.9
	3	42.1	<b>14.7</b>	<b>203.8</b>
O-17	1	34.6	7.5	226.6
	3	32.1	<b>11.3</b>	<b>218.2</b>

1x10<sup>6</sup> cellules BW5147.3 ont été transfectées avec 1 ou 3 µg du vecteur pcp2-hrGFP par nucleofection suivant des programmes pré-déterminés. Le pourcentage de mortalité, de cellules positives et la fluorescence moyenne est indiqué pour chaque condition.

En résumé, trois différentes constructions ont été réalisées lors de ces travaux; les vecteurs contenant les récepteurs T artificiels (avec ou sans CD28), le vecteur bicistronique permettant l'expression simultanée d'IL-10 cellulaire ou virale et du TGF-β, et le vecteur rapporteur pSRαblastLuc. Une fois co-transfectés, tous ces outils générés permettront de valider la thérapie expérimentale visant à protéger les organes greffés.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Construction du vecteur pSR $\alpha$ blastLuc

Un quatrième membre de la famille SR $\alpha$  portant le gène de résistance à la blasticidine a été construit et la luciférase y a été clonée. Le vecteur pSR $\alpha$ blastLuc possède le promoteur SR $\alpha$  qui permet une expression élevée de la luciférase. Les résultats obtenus avec les cellules BW5147.3 montrent que l'activité du promoteur SR $\alpha$  est environ 20 fois supérieure au promoteur SV40 et suite à l'activation cellulaire, l'activité de SR $\alpha$  est augmentée d'environ 6 fois (Figure 11). Comme l'expression de gènes insérés dans le dernier cistron des vecteurs tri-cistroniques est trop faible, un vecteur bicistronique est plus approprié pour exprimer les cytokines immunosuppressives. Le vecteur pSR $\alpha$ blastLuc pourra donc servir de rapporteur qui sera co-transfecté dans les cellules BW5147.3 avec le vecteur bicistronique et le vecteur contenant le récepteur T artificiel. Afin d'évaluer la survie et la distribution de cellules modifiées injectées *in vivo*, les cellules pourront être détectées par imagerie intra-vitale après avoir fait boire le substrat luciférine aux souris.

### 4.2. Production d'un vecteur bicistronique inductible

Un promoteur inductible sensible à l'activation cellulaire permet d'obtenir une production localisée d'IL-10 virale ou cellulaire et du TGF- $\beta$ . Afin de permettre la sécrétion concomitante de deux cytokines et limiter le nombre de constructions à transférer dans les mêmes cellules, un vecteur bi-cistronique a été créé. Celui-ci possède une séquence IRES qui permet l'entrée interne de ribosomes sur l'ARNm. Initialement tri-cistronique, l'expression individuelle de la hrGFP dans les trois cistrons du vecteur a été évaluée par cytométrie. Les résultats présentés à la figure 12 montrent que l'expression issue du dernier cistron est réduite d'environ 50% par rapport aux deux premiers cistrons, résultats obtenus avec d'autres vecteurs similaires [97]. La détection de l'expression issue du troisième cistron, aussi faible soit-elle, assure néanmoins une forte expression à partir des deux premiers cistrons. La co-expression de deux protéines a ensuite été analysée au FACS et au microscope à fluorescence avec la DsRed2 clonée dans le premier ou second cistron et la hrGFP clonée dans le dernier cistron. La figure 13

montre qu'il existe une belle corrélation entre la fluorescence émise et la co-expression. L'observation au microscope à fluorescence (Figure 14) a permis de visualiser les cellules co-exprimant les deux fluorochromes. La fonctionnalité du vecteur tri-cistronique ayant été démontrée, quatre vecteurs exprimant des marqueurs de résistance différents ont été générés (Annexe I). Les vecteurs SR $\alpha$ puroG, SR $\alpha$ neoR, SR $\alpha$ hygroY et SR $\alpha$ blastC possèdent respectivement dans leur dernier cistron les gènes de la hrGFP, la DsRed2, la EYFP et la ECFP. Ces derniers permettent l'expression maximale de 8 gènes différents dans une même cellule et peuvent être sélectionnés avec la puromycine, la neomycine, l'hygromycine B ou la blasticidine S. Dans cette étude, un vecteur bi-cistronique a été sélectionné par rapport à un vecteur tri-cistronique puisque l'activité issue du dernier cistron était trop faible telle que démontrée avec les essais luciférase (Figure 17).

Le système d'expression proposé dépend d'une production localisée de cytokines immunosuppressives. L'induction de cellules régulatrices ne pourrait être envisagée par administration systémique de ces cytokines car cela mènerait à un état de suppression généralisé similaire à l'usage de la cyclosporine A. De plus, une régulation précise de la production d'immunosuppresseurs est souhaitable puisque de nombreux exemples dans la littérature montrent qu'une trop faible ou forte expression peut initier des pathologies. Un promoteur inductible suite à l'activation cellulaire a été choisi par rapport à un promoteur constitutif. Comme il a été démontré (résultats non présentés) que les BW5147.3 produisent de l'IL-2 suite à l'activation avec PMA et ionomycine, ces cellules possèdent tous les facteurs de transcription requis pour transactiver le promoteur de l'IL-2 qui a été choisi. Le promoteur de l'IL-2 s'est avéré assez efficace chez les cellules Jurkat 77.6 (Figure 16). Ce dernier possède cependant une activité constitutive de base sans stimulation qui a été confirmée avec les cellules BW5147.3 (Figure 17). L'inductibilité du promoteur de l'IL-2 n'est donc pas parfaite et suggère qu'un promoteur cryptique serait présent dans le vecteur. Ceci pourrait causer une immunosuppression non-localisée, mais qui serait de courte durée puisque les cytokines sont instables et qu'après une courte période de temps, les BW5147.3 auraient rejoint l'organe greffé reconnu par le récepteur T artificiel. Deux solutions ont cependant été envisagées afin d'optimiser le promoteur de l'IL-2. La première concerne l'ajout d'un site de polyadénylation devant ce dernier afin

de terminer efficacement toute transcription issue du promoteur cryptique. Il serait aussi possible d'ajouter un site de liaison au NFAT trimérisé afin de maximiser l'induction du promoteur [144]. Une conclusion peut être tirée des figures 16 et 17 qui montrent que le signal de co-stimulation augmente la réponse du promoteur de l'IL-2 lequel comporte une séquence d'élément de réponse au CD28. Ainsi, le récepteur T artificiel possédant le CD28 serait le meilleur candidat pour induire la production de cytokines immunosuppressives.

#### 4.3. Production de récepteurs T artificiels

La reconnaissance de molécules spécifiques aux organes greffés est nécessaire pour développer une thérapie visant à contrer le rejet de greffe et l'utilisation d'un récepteur T artificiel permet ceci. Ce récepteur est constitué dans sa portion extracellulaire d'un scFv et comme les CMH-I exprimés par toutes les cellules diffèrent d'un individu à l'autre, ceux-ci constituent une cible idéale pour le scFv. Afin d'éviter des réponses immunitaires contre l'anticorps de rat K204, l'anticorps murin B8-24-3, duquel un scFv a été dérivé, a été choisi. Ce dernier reconnaît spécifiquement les CMH-I d'haplotypes b et p qui sont exprimés par les souris donneuses dans le modèle murin de rejet d'allogreffes utilisé. Il a été démontré que l'anticorps B8-24-3 reconnaît les allèles D<sup>p</sup>, K<sup>b</sup> et K<sup>p</sup>. Deux types de récepteurs T artificiels ont été créés, le premier contenant la portion de signalisation du CD3  $\zeta$  alors que le second possède aussi l'unité de signalisation du CD28. Ces deux chimères contenant le scFv B8-24-3 ont été générées pour être comparées entre elles. L'avantage que confère le CD28 au récepteur reste cependant à être démontré. La mesure indirecte des niveaux de cytokines immunosuppressives produites permettra de comparer ces deux récepteurs T artificiels. En principe, la chimère CD28-CD3  $\zeta$  devrait être bien exprimée à la surface cellulaire puisque les expériences réalisées ont été effectuées dans des lignées murines T [74]. Il a été démontré que le CD28 murin possédait un motif di-leucine qui pouvait réduire son expression à la surface cellulaire [74], c'est pourquoi le CD28 humain a été choisi. La portion du CD28 ne possède aucune région extra-cellulaire et ne devrait donc pas causer de réponse xénogénique *in vivo*. Si un tel motif de rétention s'avérait présent dans la séquence humaine, il pourrait être modifié par mutagenèse dirigée.

#### 4.4. Fonctionnalité des récepteurs

Puisque aucun anticorps spécifique à la portion du CD8 $\alpha$  utilisé ou le scFv du récepteur T artificiel n'existent, un RT-PCR a été effectué après transfection de cellules murines. À la figure 21, l'amplicon du récepteur T artificiel avec CD28 semble présenter un doublet qui pourrait signifier une contamination par un plasmide étranger. Bien que cette bande soit légèrement supérieure à l'amplicon du récepteur T artificiel sans CD28, il serait difficile d'exclure la possibilité d'une contamination par ce dernier. D'une manière comme de l'autre, l'échantillon d'ADN devrait être retransformé et les colonies bactériennes analysées pour la présence de deux vecteurs. Une amplification non-spécifique ou encore un artefact de chargement serait peut-être aussi à l'origine de l'apparition de ce doublet. Même si la figure 21 montre une forte expression des deux types de récepteurs T artificiels, la fonctionnalité de ceux-ci n'a pas été établie et reste difficile à réaliser avec les cellules BW5147.3. En effet, le taux de transfusions stables est très faible avec ces cellules et aucun tri cellulaire ne peut être effectué en l'absence d'anticorps spécifiques. D'autres cellules murine T telles les 58 $\alpha\beta$  ont été employées pour palier à ces difficultés de transfection, mais ces dernières se sont avérées non-transfectables. En transitoire, les transfusions chez les cellules BW5147.3 sont efficaces et pourraient être utilisées pour effectuer des co-cultures avec des cellules Hela exprimant les différents CMH-I reconnus. Ceci prouverait l'expression en surface des récepteurs et démontrerait la reconnaissance des ligands par détection d'IL-2 dans les surnageants de culture. Ainsi, un taux d'IL-2 plus élevé devrait être observé dans une co-culture de cellules Hela exprimant les CMH-I H-2D<sup>P</sup>, K<sup>b</sup> et K<sup>P</sup> alors qu'aucune production d'IL-2 ne devrait être observée avec les cellules exprimant les CMH-I H-2 D<sup>k</sup> et K<sup>k</sup> non reconnus par le scFv. Ces mesures seraient effectuées par test ELISA ou test de prolifération avec des cellules CTLL-2 dont la survie dépend de l'IL-2. Une nouvelle technique de transfection, la nucleofection, a été mise au point et semble permettre d'effectuer des transfusions stables avec les BW5147.3 même si, dans l'expérience d'optimisation avec la hrGFP, le taux de transfection demeure faible (de l'ordre de 10 à 15% de cellules positives) mais nettement supérieur à toutes autres techniques évaluées. L'usage de tétramères de H-2K<sup>b</sup> conjugués à la phycoerythrine permettrait de vérifier l'expression en surface des récepteurs T artificiels et de trier au FACS les cellules positives.

#### 4.5. Détection de cytokines immunosuppressives

Afin d'imiter la réponse d'une cellule régulatrice de type Tr1, les ADNc d'IL-10 et du TGF- $\beta$  ont été clonés dans les deux premiers cistrons du vecteur bi-cistronique pour être co-exprimés. L'IL-10 cellulaire humaine et virale ont été choisies puisqu'elles sont fonctionnelles chez la souris [117, 121]. L'IL-10 virale qui ne possède que les propriétés suppressives de l'IL-10 cellulaire a été générée par mutagenèse dirigée afin d'être comparée à son homologue. Deux constructions, dont l'une contenant l'IL-10c et le TGF- $\beta$  et l'autre contenant l'IL-10v et le TGF- $\beta$  ont été créées. Le TGF- $\beta$ 1 activé a aussi été produit par mutagenèse dirigée sur le TGF- $\beta$ 1 latent en changeant les résidus C223 et C225 par des sérines. Ce dernier reste à être cloné dans les constructions bicistroniques afin de générer deux vecteurs ayant d'une part l'IL-10c et le TGF- $\beta$ a et d'autre part, l'IL-10v et le TGF- $\beta$ a. Bien que l'efficacité des deux premiers cistrons pour exprimer des gènes ait été établie, le taux de cytokines produites devra être mesuré par test ELISA. La détection de l'IL-10v avec un anticorps anti-IL-10 humain ne devrait poser aucun problème puisqu'un seul acide aminé a été changé. Malgré tout, les essais préliminaires réalisés (résultats non montrés) suggèrent que l'ELISA n'est peut-être pas le test le plus sensible pour détecter l'IL-10 puisque le surnageant de cellules HL-60 utilisé comme témoin positif donne des valeurs à la limite de détection de la trousse. La détection par ELISA du TGF- $\beta$  qui utilise un anticorps qui ne reconnaît que sa forme active permettrait de valider que le TGF- $\beta$  actif est fonctionnel. Des tests fonctionnels ont aussi été envisagés pour mesurer ces deux cytokines. Les surnageants de culture de cellules BW5147.3 transfectées avec les différentes constructions seraient mis en présence de la lignée mastocytaire D36 sensible à l'IL-10 humaine [145] ou la lignée de cellules épithéliales de poumons de vison CCL-64 sensible au TGF- $\beta$  [146], puis la prolifération cellulaire serait mesurée par incorporation de thymidine tritiée. Finalement, il faut noter que la lignée BW5147.3 sécrète de l'IL-2 suite à une stimulation cellulaire et cette cytokine possède des propriétés opposées aux effets immunosuppressifs désirés. La présence d'IL-2 est cependant souhaitable puisqu'elle est indispensable à l'activation des cellules Tregs. Dans un contexte thérapeutique, des cellules irradiées seraient utilisées afin d'empêcher leur prolifération *in vivo*.

#### 4.6. Activité NK

Dans le modèle de rejet d'allogreffe murin développé dans le laboratoire du Dr. Daniel, des souris C57BL/6J Tcra<sup>tm1/Mom</sup> (H-2<sup>b</sup>) ont été croisées avec des souris B6.AKR (H-2<sup>k</sup>) afin d'avoir des souris sur un fond génétique approprié (H-2<sup>k</sup>) [147]. Les souris TCR $\alpha$ KOK sont déficientes dans l'expression de la chaîne  $\alpha$  du RcT. Cette chaîne est requise pour la différenciation des thymocytes du stade double positif à simple positif et son absence entraîne la perte de cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> [148]. Les cellules BW5147.3 exprimant le même haplotype que les souris receveuses (H-2<sup>k</sup>) ont été choisies afin de minimiser leur rejet une fois introduites *in vivo*. L'injection de cellules transfectées avec la hrGFP avait pour objectif d'évaluer la survie des BW5147.3 *in vivo*. Suite à l'injection i.v., après une heure la majorité des cellules auraient dû se retrouver dans les poumons, mais aucune n'y a été détectée, ni dans les autres organes analysés ou dans le sang. Comme aucune expérience utilisant des cellules BW5147.3 non-transfectées n'a été réalisée afin de déterminer si ces dernières étaient aussi rejetées par les souris receveuses, il est impossible de préciser le rôle joué par l'ajout de la hrGFP dans le rejet. La hrGFP avait cependant été choisie parce qu'elle était plus brillante et moins toxique que la GFP. Un rejet aussi rapide, que ce soit de cellules transfectées ou même non-transfectées, implique cependant le développement d'alternatives. Étant déficientes en cellules T, les souris receveuses TCR $\alpha$ KOK n'ont comme seule défense que l'immunité innée, entre autres, les cellules NK. Comme l'absence de cellules T ne permet pas de connaître l'effet sur cette forme d'immunité, il est possible qu'une augmentation du nombre de cellules NK ou de leur activité cytolytique existe chez ces souris qui expliquerait le rejet des cellules BW5147.3. Cette attaque NK est un inconvénient qui pourrait cependant être contrôlée par l'expression de CMH-I classiques ou de CMH-I non classiques à la surface des BW5147.3. Les cellules NK murines expriment deux familles de récepteurs inhibiteurs, soit Ly49 et CD94/NKG2R qui reconnaissent les CMH-Ia ou b. Le peptide Qdm lié au CMH-Ib Qa-1<sup>b</sup> fixe le récepteur CD94/NKG2R et envoie un signal inhibiteur dominant aux cellules NK [149]. Comme environ 50% des cellules NK expriment ce récepteur, la protection conférée par ce CMH de classe Ib pourrait être comparée aux molécules de classes Ia D<sup>b</sup> et K<sup>b</sup>. Ceux-ci confèrent une protection similaire à Qdm/Qa-1<sup>b</sup> par la transmission d'un signal négatif aux cellules NK via le Ly49 [149]. Bien que la

réponse des cellules NK résulte d'une balance d'interactions entre CMH-I et récepteur, la transfection de CMH-I non-classiques pourrait réduire, du moins en partie, le rejet des BW5147.3. De même, une augmentation de l'expression de H-2D<sup>k</sup> exprimé par les cellules BW5147.3 suite à un traitement à l'INF- $\gamma$  pourrait aussi protéger les cellules d'une lyse par les cellules NK [150]. Ceci pourrait être effectué par un traitement *in vitro* avec cette cytokine avant injection des BW5147.3 aux souris receveuses. Il a été démontré que l'expression de H-2D<sup>k</sup> demeure élevée pendant au moins deux jours malgré l'absence d'INF- $\gamma$  *in vivo* pour ensuite graduellement diminuer vers le troisième jour et revenir au niveau basal au quatrième jour [151]. Dans le modèle thérapeutique proposé, une lyse après un certain temps des cellules portant les récepteurs T artificiels et pouvant reconnaître les CMH-I du donneur ne serait pas problématique puisque ces dernières auront eu le temps de reconnaître leur ligand et d'initier la sécrétion locale d'immunosuppresseurs. Une réponse régulatrice, du type Tr1 serait initiée et les cellules effectrices du receveur devraient polariser à leur tour des cellules T à proximité de l'organe greffé.

## 5. CONCLUSION

Les travaux réalisés lors de cette étude ont permis de générer les outils qui seront utilisés dans le cadre d'une thérapie visant à protéger les organes greffés. La reconnaissance spécifique des greffons est assurée grâce aux récepteurs T artificiels qui ont été construits. Exprimés à la surface cellulaire, ceux-ci sont formés d'un scFv dérivé de l'anticorps B8-24-3 qui reconnaît uniquement les CMH-I de souris donneuses dans le modèle murin de rejet d'allogreffe. Combinant les propriétés de signalisation intracellulaire de CD3  $\zeta$  et CD28, ces récepteurs induisent le promoteur d'IL-2, ce qui assure un certain contrôle sur l'expression d'IL-10 et de TGF- $\beta$ . La production de ces cytokines permet de mimer le pouvoir suppresseur des cellules T régulatrices, comme les cellules Tr1. La sécrétion d'IL-10 et du TGF- $\beta$  par les Tr1 induit non seulement la tolérance de lymphocytes T effecteurs qui attaqueraient le greffon mais devrait aussi contribuer à propager le phénotype régulateur par tolérance infectieuse.

Trois constructions différentes ont été générées; le vecteur contenant les récepteurs T artificiels, le vecteur bicistronique contenant les ADNc de l'IL-10 cellulaire ou virale et du TGF- $\beta$  et le vecteur rapporteur pSR $\alpha$ blastLuc. Co-transfectés dans les cellules BW5147.3, les transfectants seront sélectionnés avec du G-418, de la puromycine et de la blasticidine S. Plusieurs études *in vitro* restent cependant à être effectuées afin de démontrer la fonctionnalité du récepteur lorsqu'il reconnaît ses ligands et afin d'induire la sécrétion de cytokines immunosuppressives. Les études *in vivo* ne pourront être réalisées qu'après l'introduction d'un quatrième vecteur ayant un gène de résistance différent comme l'hygromycine pour exprimer le CMH de classe Ib Qa-1<sup>b</sup> et son peptide Qdm lié de manière covalente à la  $\beta_2$ -m. Alternativement, l'injection de cellules BW5147.3 transfectées avec les trois premières constructions pourrait être accomplie après un traitement à l'IFN- $\gamma$  pour augmenter l'expression de CMH de classe Ia à la surface et diminuer les risques de rejet par les cellules NK. Des essais luciférase seront effectués chez les souris récipiendaires afin de ré-évaluer la survie des cellules injectées. Selon les résultats obtenus et pour valider l'efficacité de la thérapie expérimentale, des souris ayant

subies une greffe de peau sans autre traitement seront comparées à des souris ayant également reçues les cellules T régulatrices artificielles.

Éventuellement cette approche pourrait être adaptée à la thérapie humaine en introduisant chez les cellules T du receveur, un récepteur T artificiel reconnaissant des CMH-I exprimés par le donneur. Le scFv spécifique au donneur pourrait être prélevé d'une banque de scFv et n'aurait qu'à être introduit dans la chimère pour remplacer un scFv pré-existant. En étant modulaire, ce système pourrait permettre de cibler d'autres molécules exprimées par des tissus spécifiques et ainsi être utilisé pour contrôler certaines maladies auto-immunitaires.

## 6. ANNEXE I

### 6.1. Article #1 : A FAMILY OF VECTORS WITH DIFFERENT SELECTION MARKERS FOR THE CO-EXPRESSION OF SEVERAL PROTEINS IN EUKARYOTIC CELLS.

#### 6.1.1. Résumé français de l'article #1

Une famille de vecteurs possédant des marqueurs de sélection différents servant à la co-expression de plusieurs protéines dans les cellules eucaryotes.

Véronique Allard, Louis de Léséleuc et François Denis

La co-expression stable de plusieurs protéines dans des cellules de mammifères requiert l'utilisation de vecteurs possédant différents marqueurs de sélection. Une famille de vecteurs d'expression a été générée à partir du promoteur SR $\alpha$  connu pour son taux d'expression en cellules eucaryotes élevée suite à des transfections stables ou transitoires. Les transfectants stables peuvent être sélectionnés soit avec du G418, de la puromycine, de l'hygromycine B ou de la blasticidine S alors qu'un taux élevé de transfections transitoires peut être obtenu avec des cellules exprimant l'antigène grand T de SV40. Ces vecteurs d'expression possèdent un site de clonage multiple étendu avec plus de 23 sites de restriction uniques. Puisque les gènes *neo*, *bsr*, et *hph* sont fonctionnels tant chez les cellules de mammifères que chez *E. coli*, les clonages sont facilités. Des versions tri-cistroniques de ces vecteurs ont été générées par insertion de deux séquences IRES. Quatre protéines fluorescentes possédant des propriétés spectrales distinctes ont été introduites dans les derniers cistrons de chaque vecteur. Les versions tri-cistroniques de ces vecteurs permettent l'expression concomitante d'un maximum de huit protéines différentes dans une même cellule et les transfectants ayant une forte expression peuvent être obtenus par tri cellulaire.

#### 6.1.2. Article # 1 complet

## TITLE PAGE

**Title:** A family of vectors with different selection markers for protein co-expression in eucaryotic cells.

**Authors:** Véronique Allard, Louis de Léséleuc and François Denis.

**From:** INRS-Institut Armand-Frappier,  
531 Boulevard des Prairies,  
Laval (Québec), H7V 1B7,  
Canada

**Correspondence to:** François Denis  
INRS-Institut Armand-Frappier,  
531 Boulevard des Prairies,  
Laval (Québec), H7V 1B7,  
Canada  
Phone: 450-686-5613  
Fax: 450-686-5301  
E-mail: [francois.denis@iaf.inrs.ca](mailto:francois.denis@iaf.inrs.ca)

**Keywords:** Superpolylinker; Selection markers; IRES; Fluorescent proteins.

**Financial Support:** This work was supported in part by grants 472805283 from ROTRF and MOP-55848 from CIHR to FD. VA was supported by a M.Sc. studentship from FRSQ.

## ABSTRACT

The stable co-expression of different proteins in mammalian cells requires vectors having different selectable markers. A family of eucaryotic expression vectors based on the strong SRalpha promoter for high-level expression in stable or transient transfections were derived. Stable transfectants can be selected with either G-418, puromycin, hygromycin B or blasticidin S, while high level transient expression can be achieved in cells harboring the SV40 large T antigen. The vectors have an extended polylinker with over 20 unique restriction sites and since the *neo*, *bsr* and *hph* resistance genes are functional in *E. coli*, shotgun cloning can easily be performed. Tricistronic vectors were derived by inserting two IRES sequences and spectrally distinct fluorescent proteins in the last cistron of each vector. The tricistronic vectors allow concomitant expression of up to eight different proteins in a single cell and high expressers can be selected by cell sorting on fluorescent protein signals.

## INTRODUCTION

Mammalian gene transfer allows functional characterization of cloned gene products which can be introduced in cultured cells through stable transfection using antibiotic selection or transient transfection, in which expression occurs shortly post-transfection. When stable transfection of several different genes is required, different selectable markers are required. For transient transfections, high-level expression can be achieved in cells expressing the simian virus 40 (SV40) large T antigen, which drives episomal replication of vectors harboring the SV40 replication origin (7). A strong promoter is needed for maximal expression and the SR $\alpha$  promoter, which is a fusion between the SV40 early promoter and the HTLV-1 RU-5 translational enhancer (14), provides high level expression, particularly in hematopoietic cells (14). Given the limited number of different selectable markers available, co-expressing several different proteins remains difficult.

Several viruses use internal ribosomal entry sites (IRES) for cap-independent translation (10,15) and the presence of IRES sequences allows multi-cistronic expression in eucaryotic cells. The sequential stable transfection of different vectors is time-consuming and several independent clones are needed to obtain high expressers. The introduction of fluorescent proteins in IRES-containing vectors circumvents this problem by allowing FACS-sorting of transfected cells to obtain high expressers. The green fluorescent protein (GFP) requires no cofactors for fluorescence and yellow (YFP) or cyan (CFP) mutants have been created. The red fluorescent protein from *Discosoma sp.* (DsRed2) complements GFP derivatives and is compatible with FACS instruments. We describe the construction and use of a family of eucaryotic expression vectors that have different selectable markers functional in *E. coli* and mammalian cells, simplifying shotgun cloning. One series have extensive polylinkers while the other series possess two IRES sequences and spectrally distinct fluorescent proteins in the last cistron. With tricistronic vectors, up to 8 proteins can be expressed in a single cell and high expressers can be obtained by cell sorting.

## MATERIALS AND METHODS

### Construction of superpolylinker vectors

All restriction and modification enzymes used were from New England Biolabs (Pickering, ON, Canada). Figure 1 summarizes superpolylinker vector construction. The RSV.5(neo) vector (9) was used as a backbone for vector construction. To obtain additional restriction sites and sequencing, the SR $\alpha$  promoter in pcDL-SR $\alpha$ 296 (14) was first excised with *XhoI* and *HindIII*, the ends filled, and subcloned in the *EcoRV* site of pBSKS+ (Stratagene, La Jolla, CA) to give pBSSR $\alpha$ . The SR $\alpha$  promoter was transferred in RSV.5(neo) to replace the RSV promoter and superfluous sequences flanking the bi-directional SV40 polyadenylation site were removed by intra-molecular deletion. To have additional selection markers, the neomycin resistance gene was replaced by puromycin (*pac*), hygromycin B (*hph*) or blasticidin S (*bsr*) resistance genes from pBABEpuro (12), RSV.5(hygro) (9) and pMODblast (InVivogen, San Diego, CA). To increase the number of unique restriction sites, the pSL1180 superpolylinker (5) was introduced to yield pSRalphaneo, pSRalphapuro, pSRalphahygro and pSRalphablast vectors.

### Construction of tricistronic vectors

Tricistronic vectors were built by introducing two copies of the ECMV IRES in pSRalpha vectors. The IRES present in pIRES (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) was digested with *MluI* and *SmaI* and cloned between the *MluI* and *PvuII* sites of pSRalphapuro to give pSRpuroIRES1. The second IRES was PCR-amplified from pIRES with 5'IRES and 3'IRES (Table 1), digested with *AgeI* and *XbaI* and cloned in the same sites of pSRpuroIRES1 to give pSRpuroIRES2. The cassette containing both IRES was excised from pSRpuroIRES2 with *SpeI* and *BamHI* and cloned in the same sites of pSRalphaneo, pSRalphahygro and pSRalphablast. Four different fluorescent proteins were then introduced in the last cistron of each vector. The humanized green fluorescent protein (hrGFP) from *R. reniformis* in phrGFP-N1 (Stratagene) was PCR-amplified using 5'hrGFP and 3'hrGFP (Table 1) digested with *NheI* and *BglII* and cloned in the same sites of pSRpuroIRES2 to give pSRalphapuroG. The fluorescent proteins from pEYFP, pECFP and pDsRed2 (BD Biosciences) were first excised with *BamHI* and *EcoRI* and subcloned in the same sites of pcDNA3.1/zeo+ (InVitrogen, Burlington, ON, Canada). The three fluorescent proteins were excised from pcDNA3.1/zeo+ with *NheI* and *EcoRI*

and cloned in the *NheI* and *MfeI* sites of tricistronic vectors to yield pSRalphahygroY, pSRalphablastC and pSRalphaneor.

### **Vector sequencing**

All vectors were completely re-sequenced by random transposition using the GPS-1 genome priming system (New England Biolabs) with pGPS2.1 as a transposon donor. Competent DH5 $\alpha$  cells were transformed with the transposition reactions and 24 individual chloramphenicol-resistant colonies per transposition reaction were amplified for cycle sequencing using primers S and N flanking the transposon. Sequencing was performed with the DTCS-I kit (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) and chromatograms were acquired on a CEQ 2000XL automated sequencer (Beckman Coulter). Sequences were aligned using Vector NTI 7.0 software (Informax, Frederick, MD).

### **Expression levels in individual cistrons**

To compare expression levels in individual cistrons, hrGFP was cloned in the first or second cistrons of pSRalphapuroIRES2 and compared to pSRalphapuroG. The hrGFP in pHRGFP-N1 was PCR amplified with 5'hrGFP and 3'hrGFP (Table 1) digested with *NheI* and *SacI* and cloned in the first cistron of pSRalphapuroIRES2 digested by *SpeI* and *SacI*. The PCR product was digested with *BspEI* and cloned between *BspEI* and the filled-in *NdeI* site of pSRalphapuroIRES2. To evaluate protein co-expression, DsRed2 was introduced in the first or second cistron of pSRalphapuroG. pDsRed2 was digested with *NotI*, the ends filled, cut with *XbaI* and cloned between the *SpeI* and *NruI* sites of pSRalphapuroG, or digested with *AgeI* and *EcoRV* and cloned between the *BspEI* and *SnaBI* sites of pSRalphapuroG. Transient transfections of 293T cells (CRL-11268; ATCC, Manassas, VA) were performed using Fugene 6 (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) according to manufacturer's instructions. 48 hrs post-transfection, cells were analyzed on a FACSVantage (BD Biosciences) flow cytometer using an argon laser tuned at 488 nm. Fluorescence signals were collected in FL1 (525 nm) for hrGFP or FL2 (575 nm) for DsRed2 then analyzed using CellQuest software (BD Biosciences).

## RESULTS AND DISCUSSION

The restriction maps of the pSRalpha vectors are shown in Figure 3. Only unique restriction sites are shown, with the exception of *PmlI* and *ApaI* sites present in each IRES sequences. The superpolylinker versions of pSRalpha vectors possess over 20 unique restriction sites that are listed in Table 2. All vectors were completely re-sequenced by random transposition and sequences have been deposited in GenBank under the following accession numbers: pSRalphahygro (AY613991), pSRalphaneo (AY613992), pSRalphablast (AY613993), pSRalphapuro (AY613994), pSRalphablastC (AY613995), pSRalphapuroG (AY613996), pSRalphaneoR (AY613997), and pSRalphahygroY (AY613998).

The pSRalpha family of vectors are based on the strong SR $\alpha$  promoter that provides high expression levels in a variety of cell lines and is comparable to the CMV promoter (14). The SRalpha promoter is composed of the SV40 early promoter fused to part of the U5 sequence (R-U5') of the HTLV-1 long terminal repeat that provides stronger expression relative to the wild-type SV40 promoter through both transcriptional and post-transcriptional mechanisms (14). The 5' untranslated region of the SV40 early promoter when fused to HTLV-1 R-U5' enhances cap-dependent mRNA translation (3) (2). This segment also stimulates transcription, although with varying efficiency in different cell types (1). Since these vectors were designed for co-expressing different proteins in the same cell, the use of the SR $\alpha$  promoter offers an additional advantage relative to other promoters. While the transcriptional activity of the SV40 early promoter is lower than the CMV promoter, similar amounts of protein can be expressed through enhanced translation. This reduces promoter interference compared to the CMV promoter which interferes with other viral promoters, including itself, limiting its use in multiple transfections (6).

Since all vectors carry the ampicillin resistance gene, bacterial transformants can be selected with 100  $\mu$ g/ml ampicillin. An additional advantage of pSRalphaneo, pSRalphahygro and pSRalphablast vectors and their tricistronic derivatives is that the resistance genes used for eucaryotic cell selection are also functional in *E. coli*. This simplifies shotgun cloning by allowing bacterial selection using 50  $\mu$ g/ml kanamycin,

100 µg/ml hygromycin B or 100 µg/ml blasticidin S. It should be noted that selection with hygromycin B or blasticidin S requires the use of low salt LB media containing 0.5 gr/l of NaCl. Sequencing or PCR amplification of inserts can be performed using the 5'SR $\alpha$  and 3'SR $\alpha$  primers (Table 1).

To evaluate expression strength in individual cistrons, hrGFP was cloned in each cistron and upon transient transfection of HEK293T cells, hrGFP fluorescence was monitored by flow cytometry. Figure 4 shows strong expression from the first two cistrons, with lower expression in the third cistron, similar to what has been described with other tricistronic vectors (8,11,17). Second cistron expression from the ECMV IRES in CMV-based vectors is known to be much lower than cap-dependent first cistron expression (13,16,17). In contrast, strong expression was observed from the second cistron (Figure 3), arguing that the SR $\alpha$  promoter might be better suited for polycistronic gene expression than the CMV promoter. Lower expression levels from the third cistron also ensures that transfected cells express high levels of upstream genes following cell sorting of fluorescent cells. Should more robust fluorescent protein expression be needed, bicistronic vectors can be created by removing one IRES using the *PmlI* or *ApaI* sites common to each IRES sequence.

To confirm protein co-expression, DsRed2 was cloned in the first or second cistron of pSRalphapuroG that harbors hrGFP in the last cistron. Following transient transfection of HEK293T cells, hrGFP and DsRed2 fluorescence was evaluated by flow cytometry using 488 nm excitation. Figure 4 shows that expression levels from the first or second cistrons closely correlates with fluorescence levels originating from third cistron expression. The nearly linear correlation between both fluorescence signals (Figures 4B and 4C) even though much lower expression arises from third cistron (Figure 3C) can be explained by DsRed2 spectral properties. While the 488 nm wavelength is efficient to excite both hrGFP and EYFP, it is sub-optimal for DsRed2 excitation, leading to 10 % maximal fluorescence (4). Thus, while hrGFP expression is lower from the third cistron, this is compensated by the lower excitation efficacy of DsRed2 using the argon laser. However, since expression from all three cistrons is proportional, populations with high expression levels can be obtained by cell sorting based on relative fluorescence intensity.

For optimal detection of all fluorescent proteins, the following settings are recommended. The 488 nm argon laser can be used for hrGFP and EYFP excitation and signals can be separated with a 525 nm shortpass (SP) dichroic filter with collection using a 510/20 bandpass (BP) filter and a 550/30 BP filter. DsRed2 can be excited at 488 nm and used with hrGFP and EYFP, but the signal is best discriminated from hrGFP and EYFP using a 560 SP dichroic filter and a 630/22 nm BP filter. Since ECFP has a low quantum yield and is poorly excited at 488 nm, a dual-laser system is needed and tuning the argon laser at 457 nm and the krypton laser at 568 nm provides optimal performance. The ECFP signal can be discriminated from hrGFP/EYFP signals with a 500 nm longpass dichroic filter and collected with a 485/22 BP filter. A 568 nm restriction band filter placed in front of the 550/30 BP filter will block stray krypton laser light and the DsRed2 signal can be collected using a 610/30 BP filter and a 595 nm cutoff filter.

In conclusion, the pSRalpha family of vectors allow the simultaneous expression of multiple proteins in mammalian cells. These vectors simplify subcloning and stable or transient co-expression of different genes. Using the four tricistronic vectors, up to 8 different proteins can be co-expressed in a single cell and strong expressers can be readily obtained by cell sorting.

## REFERENCES

1. **Attal, J., M.C. Theron, G. Kann, P. Bolifraud, C. Puissant and L.M. Houdebine.** 2000. The stimulation of gene expression by the R region from HTLV-1 and BLV. *J Biotechnol* 77:179-189.
2. **Attal, J., M.C. Theron, C. Puissant and L.M. Houdebine.** 1999. Effect of intercistronic length on internal ribosome entry site (IRES) efficiency in bicistronic mRNA. *Gene Expr* 8:299-309.
3. **Attal, J., M.C. Theron, F. Taboit, M. Cajero-Juarez, G. Kann, P. Bolifraud and L.M. Houdebine.** 1996. The RU5 ('R') region from human leukaemia viruses (HTLV-1) contains an internal ribosome entry site (IRES)-like sequence. *FEBS Lett* 392:220-224.
4. **Baird, G.S., D.A. Zacharias and R.Y. Tsien.** 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11984-11989.
5. **Brosius, J.** 1989. Superpolylinkers in cloning and expression vectors. *DNA* 8:759-777.
6. **Chen, P.H., W.B. Tseng, Y. Chu and M.T. Hsu.** 2000. Interference of the simian virus 40 origin of replication by the cytomegalovirus immediate early gene enhancer: evidence for competition of active regulatory chromatin conformation in a single domain. *Mol Cell Biol* 20:4062-4074.
7. **Chittenden, T., A. Frey and A.J. Levine.** 1991. Regulated replication of an episomal simian virus 40 origin plasmid in COS7 cells. *J Virol* 65:5944-5951.
8. **Fan, L., J.S. Owen and G. Dickson.** 1999. Construction and characterization of polycistronic retrovirus vectors for sustained and high-level co-expression of apolipoprotein A-I and lecithin-cholesterol acyltransferase. *Atherosclerosis* 147:139-145.
9. **Long, E.O., S. Rosen-Bronson, D.R. Karp, M. Malnati, R.P. Sekaly and D. Jaraquemada.** 1991. Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and lymphoid cells. *Hum Immunol* 31:229-235.
10. **Martinez-Salas, E.** 1999. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 10:458-464.
11. **Metz, M.Z., A. Pichler, K. Kuchler and S.E. Kane.** 1998. Construction and

characterization of single-transcript tricistronic retroviral vectors using two internal ribosome entry sites. *Somat Cell Mol Genet* 24:53-69.

12. **Morgenstern, J.P. and H. Land.** 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* 18:3587-3596.

13. **Sugimoto, Y., I. Akseptijevich, G.J. Murray, R.O. Brady, I. Pastan and M.M. Gottesman.** 1995. Retroviral coexpression of a multidrug resistance gene (MDR1) and human alpha-galactosidase A for gene therapy of Fabry disease. *Hum Gene Ther* 6:905-915.

14. **Takebe, Y., M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hoy, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida and N. Arai.** 1988. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol* 8:466-472.

15. **Vagner, S., B. Galy and S. Pyronnet.** 2001. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2:893-898.

16. **Zhou, Y., J. Aran, M.M. Gottesman and I. Pastan.** 1998. Co-expression of human adenosine deaminase and multidrug resistance using a bicistronic retroviral vector. *Hum Gene Ther* 9:287-293.

## TABLES

Table 1. Primers used for PCR amplification and sequencing

Name	Primer sequence (5' → 3')
5'blast	TGTAGTTAACA <u>AAGCTTAATTTAAACAGTAGTTG</u>
3'blast	CAAGTACACCAGGAACTAAACGTTAACTCGC
5'IRES	CGA <u>ACCGGTATCTAGGGCGGCCAATTCCG</u>
3'IRES	CCTTTGAAAAACACGATGATAAT <u>CTAGACAC</u>
5'hrGFP	AAAGCTAGCACCATGGTGAGCAAGCAGATCCT
3'hrGFP	AA <u>AGATCTGAGTCCGGAGAGCTCTCACACCCACTCG</u>
5'SR $\alpha$	TGCTTGCTCAACTCTACGTC
3'SR $\alpha$	ACTGCATTCTAGTTGTGGTT

Restriction sites used for cloning are underlined.

Table 2. Unique restriction sites in pSRalpha superpolylinkers

Vector	Unique restriction sites in order of appearance
pSRalphablast (28)	<i>EcoRI, MscI, SpeI, XhoI, BsrGI, SacII, NruI, BsiWI, MluI, NarI, PvuII, EagI, NotI, NdeI, BspEI, Bst1107I, SnaBI, AgeI, KpnI, XbaI, NheI, Eco47III, EcoRV, BssHII, BglII, BclI, MfeI, BamHI</i>
pSRalphapuro (22)	<i>EcoRI, SpeI, XhoI, SacI, BsrGI, NruI, MluI, PvuII, NotI, NdeI, BspEI, Bst1107I, SnaBI, AgeI, KpnI, NheI, Eco47III, EcoRV, BglII, BclI, MfeI, BamHI</i>
pSRalphaneo (21)	<i>EcoRI, SpeI, XhoI, SacI, BsrGI, SacII, NruI, BsiWI, MluI, NotI, NdeI, BspEI, Bst1107I, SnaBI, AgeI, KpnI, NheI, Eco47III, EcoRV, MfeI, BamHI</i>
pSRalphahygro (24)	<i>MscI, SpeI, XhoI, SacI, BsrGI, NruI, BsiWI, MluI, NarI, PvuII, NotI, Bst1107I, SnaBI, AgeI, KpnI, XbaI, NheI, Eco47III, EcoRV, BssHII, BglII, BclI, MfeI, BamHI</i>

The number of unique restriction sites is shown in parentheses.

# FIGURES

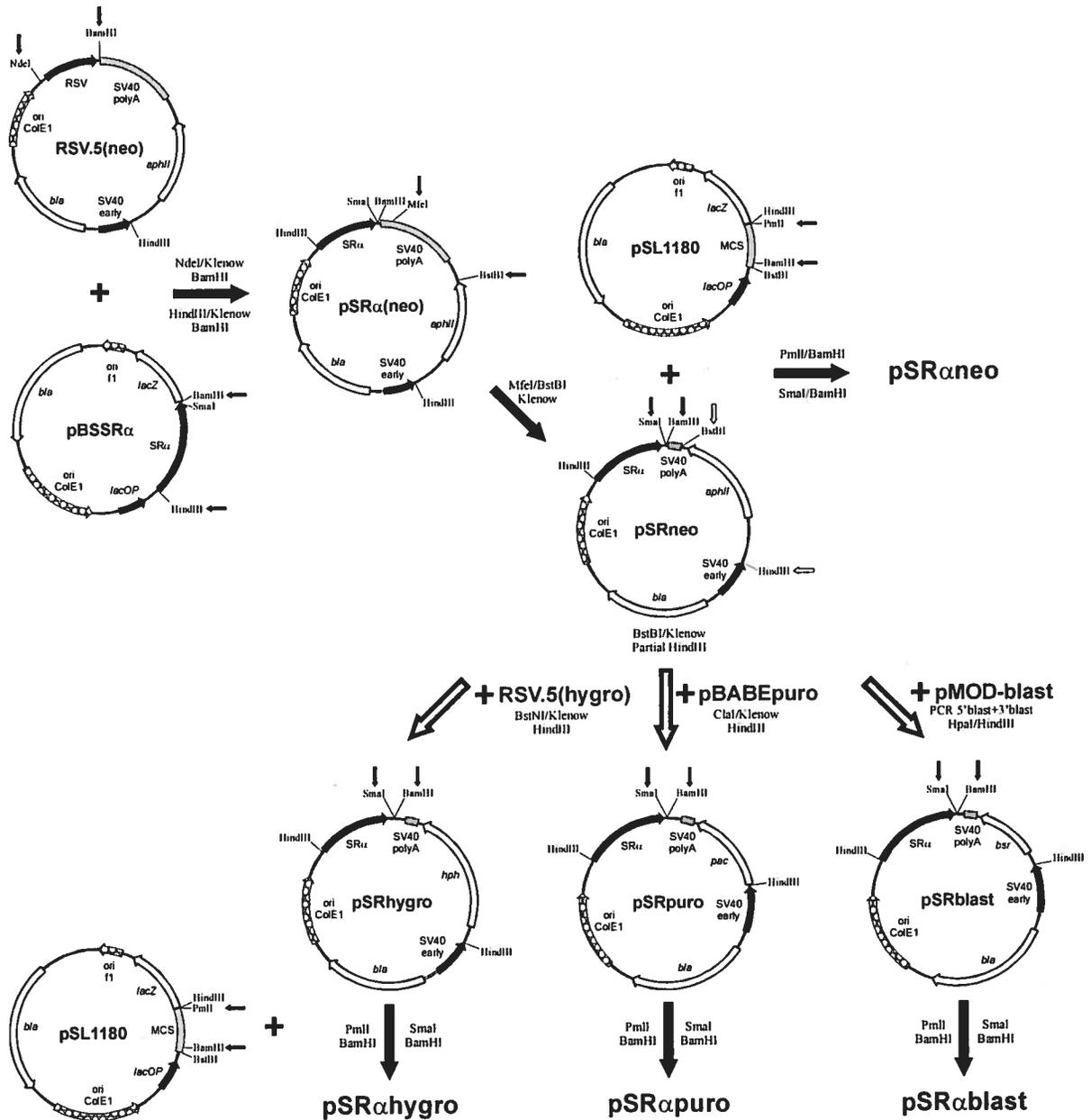
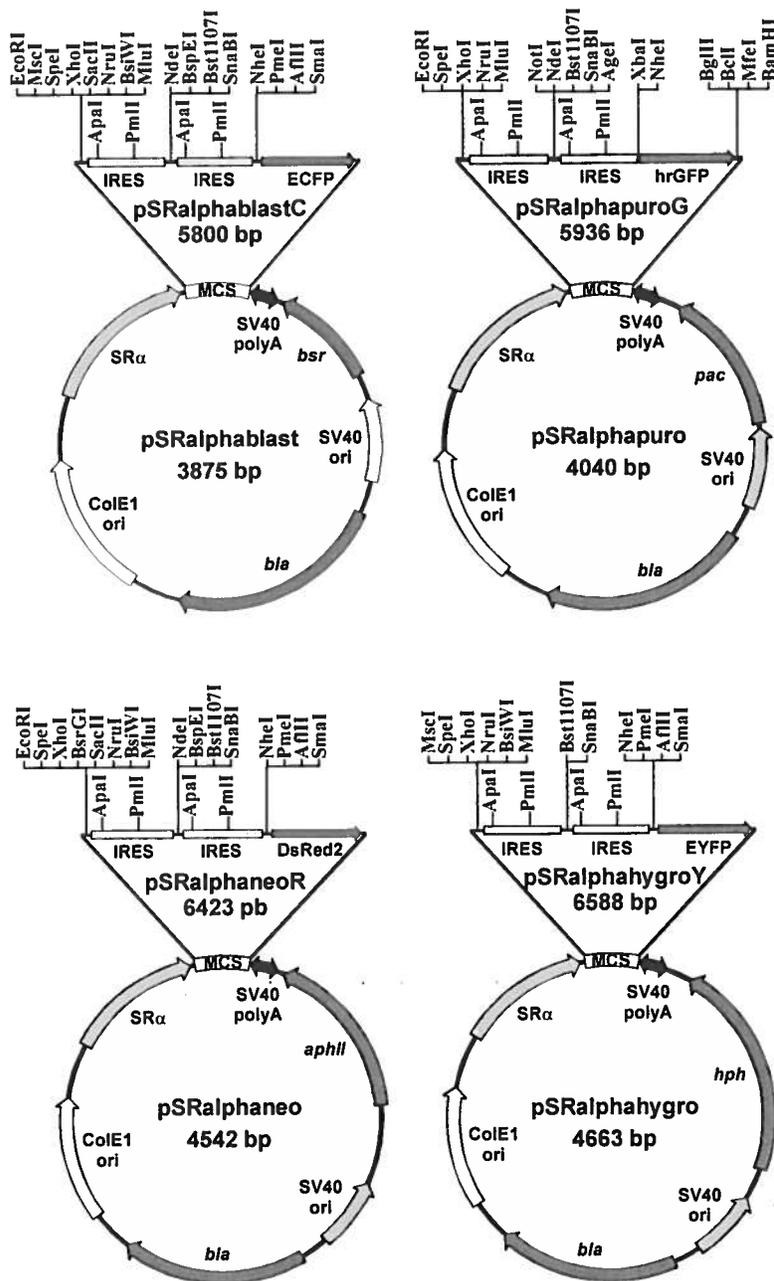
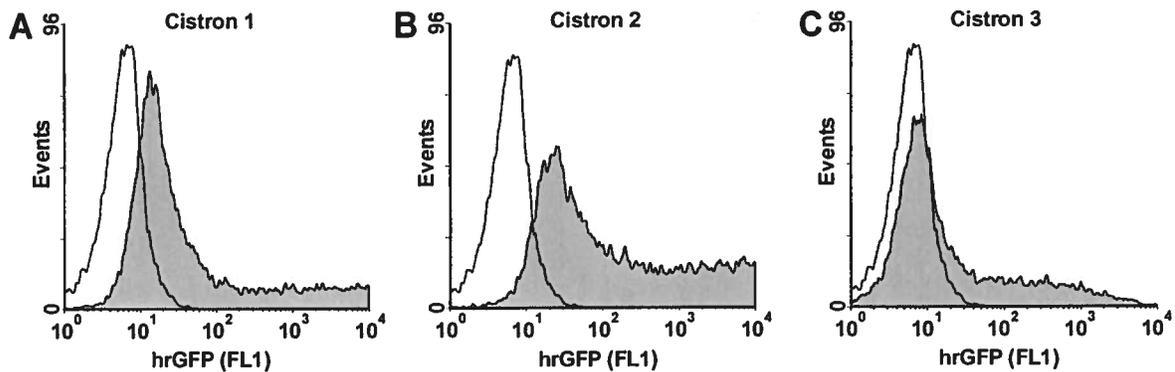


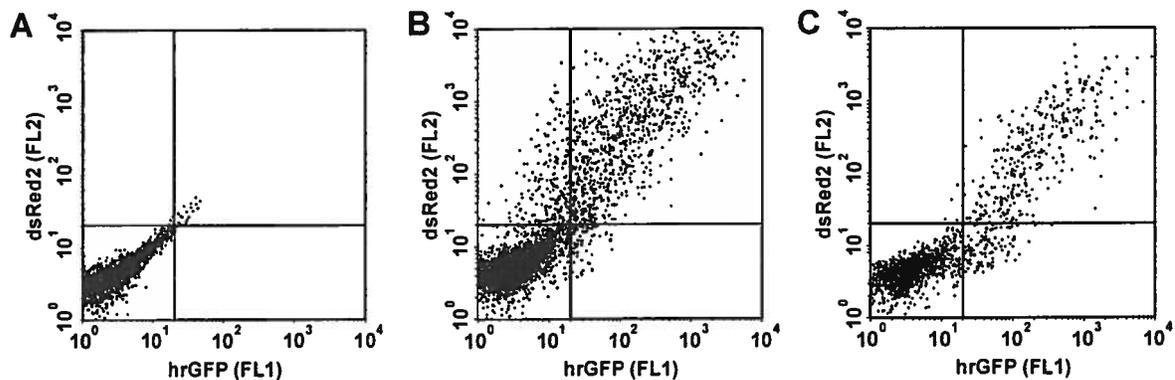
Figure 1. Summary of the construction of pSR $\alpha$  superpolylinker vectors.



**Figure 2. Restriction maps of pSRalpha vectors.** Unique restriction sites in tricistronic vectors are shown. MCS: multiple cloning site; *bla*: ampicillin resistance; *bsr*: blasticidin S resistance; *pac*: puromycin resistance; *aphII*: neomycin resistance; *hph*: hygromycin B resistance.



**Figure 3. FACS analysis of transient hrGFP expression in individual cistrons.** White: untransfected 293T cells; gray: transfected 293T cells. (A) Fluorescence intensity of hrGFP in the first cistron. (B) Fluorescence intensity of hrGFP in the second cistron. (C) Fluorescence intensity of hrGFP in the third cistron.



**Figure 4. Two-color FACS analysis of transient fluorescent protein co-expression.** (A) Auto-fluorescence of untransfected 293T cells. (B) Fluorescence intensity of DsRed2 in the first cistron and hrGFP in the third cistron in transfected 293T cells. (C) Fluorescence intensity of DsRed2 in the second cistron and hrGFP in the third cistron in transfected 293T cells.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

1. GERSHON, R. K. et K. KONDO. 1970. «Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes». Immunology, vol. 18, no. 5, p. 723-737.
2. SHEVACH, E. M. 2000. «Regulatory T cells in autoimmunity\*». Annu Rev Immunol, vol. 18, p. 423-449.
3. MOTTET, C., H. H. UHLIG et F. POWRIE. 2003. «Cutting edge: cure of colitis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells». J Immunol, vol. 170, no. 8, p. 3939-3943.
4. READ, S. et F. POWRIE. 2001. «CD4<sup>+</sup> regulatory T cells». Curr Opin Immunol, vol. 13, no. 6, p. 644-649.
5. CUROTTO DE LAFAILLE, M. A. et J. J. LAFAILLE. 2004. «The role of regulatory T cells in allergy». Springer Semin Immunopathol, vol. 25, no. 3-4, p. 295-310.
6. XU, D., H. LIU, M. KOMAI-KOMA, C. CAMPBELL, C. MCSHARRY, J. ALEXANDER et F. Y. LIEW. 2003. «CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and colitis in mice». J Immunol, vol. 170, no. 1, p. 394-399.
7. COBBOLD, S. P., L. GRACA, C. Y. LIN, E. ADAMS et H. WALDMANN. 2003. «Regulatory T cells in the induction and maintenance of peripheral transplantation tolerance». Transpl Int, vol. 16, no. 2, p. 66-75.
8. ZELENKA, D., E. ADAMS, S. HUMM, C. Y. LIN, H. WALDMANN et S. P. COBBOLD. 2001. «The role of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in determining transplantation rejection or tolerance». Immunol Rev, vol. 182, p. 164-179.
9. GILLIET, M. et Y. J. LIU. 2002. «Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells». Hum Immunol, vol. 63, no. 12, p. 1149-1155.
10. CHEN, W. et S. M. WAHL. 2003. «TGF-β: the missing link in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell-mediated immunosuppression». Cytokine Growth Factor Rev, vol. 14, no. 2, p. 85-89.
11. SAKAGUCHI, S., N. SAKAGUCHI, J. SHIMIZU, S. YAMAZAKI, T. SAKIHAMA, M. ITOH, Y. KUNYASU, T. NOMURA, M. TODA et T. TAKAHASHI. 2001. «Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance». Immunol Rev, vol. 182, p. 18-32.
12. SAKAGUCHI, S., N. SAKAGUCHI, M. ASANO, M. ITOH et M. TODA. 1995. «Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor

alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases». J Immunol, vol. 155, no. 3, p. 1151-1164.

13. PICCIRILLO, C. A. et E. M. SHEVACH. 2001. «Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells». J Immunol, vol. 167, no. 3, p. 1137-1140.

14. SHEVACH, E. M. 2002. «CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers». Nat Rev Immunol, vol. 2, no. 6, p. 389-400.

15. THORNTON, A. M. et E. M. SHEVACH. 1998. «CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production». J Exp Med, vol. 188, no. 2, p. 287-296.

16. JONULEIT, H., E. SCHMITT, M. STASSEN, A. TUETTENBERG, J. KNOP et A. H. ENK. 2001. «Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood». J Exp Med, vol. 193, no. 11, p. 1285-1294.

17. JONULEIT, H., E. SCHMITT, H. KAKIRMAN, M. STASSEN, J. KNOP et A. H. ENK. 2002. «Infectious tolerance: human CD25<sup>+</sup> regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4<sup>+</sup> T helper cells». J Exp Med, vol. 196, no. 2, p. 255-260.

18. LEVINGS, M. K., R. BACCHETTA, U. SCHULZ et M. G. RONCAROLO. 2002. «The role of IL-10 and TGF- $\beta$  in the differentiation and effector function of T regulatory cells». Int Arch Allergy Immunol, vol. 129, no. 4, p. 263-276.

19. LEVINGS, M. K., R. SANGREGORIO, C. SARTIRANA, A. L. MOSCHIN, M. BATTAGLIA, P. C. ORBAN et M. G. RONCAROLO. 2002. «Human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T suppressor cell clones produce transforming growth factor  $\beta$ , but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells». J Exp Med, vol. 196, no. 10, p. 1335-1346.

20. ANNACKER, O., R. PIMENTA-ARAÚJO, O. BURLLEN-DEFRANOUX, T. C. BARBOSA, A. CUMANO et A. BANDEIRA. 2001. «CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10». J Immunol, vol. 166, no. 5, p. 3008-3018.

21. HARA, M., C. I. KINGSLEY, M. NIIMI, S. READ, S. E. TURVEY, A. R. BUSHELL, P. J. MORRIS, F. POWRIE et K. J. WOOD. 2001. «IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo». J Immunol, vol. 166, no. 6, p. 3789-3796.

22. STEPHENS, L. A. et D. MASON. 2000. «CD25 is a marker for CD4<sup>+</sup> thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> subpopulations». J Immunol, vol. 165, no. 6, p. 3105-3110.

23. READ, S., V. MALMSTROM et F. POWRIE. 2000. «Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation». J Exp Med, vol. 192, no. 2, p. 295-302.
24. BAECHEER-ALLAN, C., J. A. BROWN, G. J. FREEMAN et D. A. HAFLEER. 2001. «CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood». J Immunol, vol. 167, no. 3, p. 1245-1253.
25. SALOMON, B., D. J. LENSCHOW, L. RHEE, N. ASHOURIAN, B. SINGH, A. SHARPE et J. A. BLUESTONE. 2000. «B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes». Immunity, vol. 12, no. 4, p. 431-440.
26. MCHUGH, R. S., M. J. WHITTERS, C. A. PICCIRILLO, D. A. YOUNG, E. M. SHEVACH, M. COLLINS et M. C. BYRNE. 2002. «CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor». Immunity, vol. 16, no. 2, p. 311-323.
27. NAGLER-ANDERSON, C., A. K. BHAN, D. K. PODOLSKY et C. TERHORST. 2004. «Control freaks: immune regulatory cells». Nat Immunol, vol. 5, no. 2, p. 119-122.
28. SHIMIZU, J., S. YAMAZAKI, T. TAKAHASHI, Y. ISHIDA et S. SAKAGUCHI. 2002. «Stimulation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance». Nat Immunol, vol. 3, no. 2, p. 135-142.
29. URAUSHIHARA, K., T. KANAI, K. KO, T. TOTSUKA, S. MAKITA, R. IYAMA, T. NAKAMURA et M. WATANABE. 2003. «Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene<sup>+</sup> regulatory T cells». J Immunol, vol. 171, no. 2, p. 708-716.
30. HORI, S., T. NOMURA et S. SAKAGUCHI. 2003. «Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3». Science, vol. 299, no. 5609, p. 1057-1061.
31. YAMAGIWA, S., J. D. GRAY, S. HASHIMOTO et D. A. HORWITZ. 2001. «A role for TGF- $\beta$  in the generation and expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human peripheral blood». J Immunol, vol. 166, no. 12, p. 7282-7289.
32. HORWITZ, D. A., S. G. ZHENG et J. D. GRAY. 2003. «The role of the combination of IL-2 and TGF- $\beta$  or IL-10 in the generation and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> regulatory T cell subsets». J Leukoc Biol, vol. 74, no. 4, p. 471-478.
33. LEE, P. T., A. PUTNAM, K. BENLAGHA, L. TEYTON, P. A. GOTTLIEB et A. BENDELAC. 2002. «Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis». J Clin Invest, vol. 110, no. 6, p. 793-800.

34. TANIGUCHI, M. et T. NAKAYAMA. 2000. «Recognition and function of V $\alpha$ 14 NKT cells». Semin Immunol, vol. 12, no. 6, p. 543-550.
35. SEO, N., S. HAYAKAWA et Y. TOKURA. 2002. «Mechanisms of immune privilege for tumor cells by regulatory cytokines produced by innate and acquired immune cells». Semin Cancer Biol, vol. 12, no. 4, p. 291-300.
36. SHIMIZU, J., S. YAMAZAKI et S. SAKAGUCHI. 1999. «Induction of tumor immunity by removing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity». J Immunol, vol. 163, no. 10, p. 5211-5218.
37. KUKREJA, A., G. COST, J. MARKER, C. ZHANG, Z. SUN, K. LIN-SU, S. TEN, M. SANZ, M. EXLEY, B. WILSON, S. PORCELLI et N. MACLAREN. 2002. «Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes». J Clin Invest, vol. 109, no. 1, p. 131-140.
38. SHARIF, S., G. A. ARREAZA, P. ZUCKER et T. L. DELOVITCH. 2002. «Regulatory natural killer T cells protect against spontaneous and recurrent type 1 diabetes». Ann N Y Acad Sci, vol. 958, p. 77-88.
39. OISHI, Y., T. SUMIDA, A. SAKAMOTO, Y. KITA, K. KURASAWA, Y. NAWATA, K. TAKABAYASHI, H. TAKAHASHI, S. YOSHIDA, M. TANIGUCHI, Y. SAITO et I. IWAMOTO. 2001. «Selective reduction and recovery of invariant V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus». J Rheumatol, vol. 28, no. 2, p. 275-283.
40. VAN DER VLIET, H. J., B. M. VON BLOMBERG, N. NISHI, M. REIJM, A. E. VOSKUYL, A. A. VAN BODEGRAVEN, C. H. POLMAN, T. RUSTEMEYER, P. LIPS, A. J. VAN DEN EERTWEGH, G. GIACCONE, R. J. SCHEPER et H. M. PINEDO. 2001. «Circulating V $\alpha$ 24<sup>+</sup> V $\beta$ 11<sup>+</sup> NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage». Clin Immunol, vol. 100, no. 2, p. 144-148.
41. YANAGIHARA, Y., K. SHIOZAWA, M. TAKAI, M. KYOGOKU et S. SHIOZAWA. 1999. «Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA)». Clin Exp Immunol, vol. 118, no. 1, p. 131-136.
42. ILLES, Z., T. KONDO, J. NEWCOMBE, N. OKA, T. TABIRA et T. YAMAMURA. 2000. «Differential expression of NK T cell V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy». J Immunol, vol. 164, no. 8, p. 4375-4381.
43. WANG, B., Y. B. GENG et C. R. WANG. 2001. «CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes». J Exp Med, vol. 194, no. 3, p. 313-320.

44. SHARIF, S., G. A. ARREAZA, P. ZUCKER, Q. S. MI, J. SONDHI, O. V. NAIDENKO, M. KRONENBERG, Y. KOEZUKA, T. L. DELOVITCH, J. M. GOMBERT, M. LEITE-DE-MORAES, C. GOUARIN, R. ZHU, A. HAMEG, T. NAKAYAMA, M. TANIGUCHI, F. LEPAULT, A. LEHUEN, J. F. BACH et A. HERBELIN. 2001. «Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes». Nat Med, vol. 7, no. 9, p. 1057-1062.
45. HONG, S., M. T. WILSON, I. SERIZAWA, L. WU, N. SINGH, O. V. NAIDENKO, T. MIURA, T. HABA, D. C. SCHERER, J. WEI, M. KRONENBERG, Y. KOEZUKA et L. VAN KAER. 2001. «The natural killer T-cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice». Nat Med, vol. 7, no. 9, p. 1052-1056.
46. SAUBERMANN, L. J., P. BECK, Y. P. DE JONG, R. S. PITMAN, M. S. RYAN, H. S. KIM, M. EXLEY, S. SNAPPER, S. P. BALK, S. J. HAGEN, O. KANAUCHI, K. MOTOKI, T. SAKAI, C. TERHORST, Y. KOEZUKA, D. K. PODOLSKY et R. S. BLUMBERG. 2000. «Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice». Gastroenterology, vol. 119, no. 1, p. 119-128.
47. GROUX, H., A. O'GARRA, M. BIGLER, M. ROULEAU, S. ANTONENKO, J. E. DE VRIES et M. G. RONCAROLO. 1997. «A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis». Nature, vol. 389, no. 6652, p. 737-742.
48. RONCAROLO, M. G., R. BACCHETTA, C. BORDIGNON, S. NARULA et M. K. LEVINGS. 2001. «Type 1 T regulatory cells». Immunol Rev, vol. 182, p. 68-79.
49. LEVINGS, M. K., R. SANGREGORIO, F. GALBIATI, S. SQUADRONE, R. DE WAAL MALEFYT et M. G. RONCAROLO. 2001. «IFN- $\alpha$  and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells». J Immunol, vol. 166, no. 9, p. 5530-5539.
50. FUKAURA, H., S. C. KENT, M. J. PIETRUSEWICZ, S. J. KHOURY, H. L. WEINER et D. A. HAFLER. 1996. «Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor- $\beta$ 1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients». J Clin Invest, vol. 98, no. 1, p. 70-77.
51. CHEN, Y., J. INOBE, V. K. KUCHROO, J. L. BARON, C. A. JANEWAY, JR. et H. L. WEINER. 1996. «Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93, no. 1, p. 388-391.
52. CHEN, Y., V. K. KUCHROO, J. INOBE, D. A. HAFLER et H. L. WEINER. 1994. «Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis». Science, vol. 265, no. 5176, p. 1237-1240.

53. WEINER, H. L. 2001. «Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$ -secreting Th3 regulatory cells». Immunol Rev, vol. 182, p. 207-214.
54. FEINBERG, M. B. et G. SILVESTRI. 2002. «T<sub>S</sub> cells and immune tolerance induction: a regulatory renaissance?». Nat Immunol, vol. 3, no. 3, p. 215-217.
55. COLOVAI, A. I., R. CIUBOTARIU, Z. LIU, R. CORTESINI et N. SUCIU-FOCA. 2001. «CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T suppressor cells represent a distinct subset in a heterogeneous population». Transplant Proc, vol. 33, no. 1-2, p. 104-107.
56. JIANG, S., S. TUGULEA, G. PENNESI, Z. LIU, A. MULDER, S. LEDERMAN, P. HARRIS, R. CORTESINI et N. SUCIU-FOCA. 1998. «Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro». Hum Immunol, vol. 59, no. 11, p. 690-699.
57. CORTESINI, R., J. LEMAULT, R. CIUBOTARIU et N. S. CORTESINI. 2001. «CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity». Immunol Rev, vol. 182, p. 201-206.
58. LIU, Z., S. TUGULEA, R. CORTESINI, S. LEDERMAN et N. SUCIU-FOCA. 1999. «Inhibition of CD40 signaling pathway in antigen presenting cells by T suppressor cells». Hum Immunol, vol. 60, no. 7, p. 568-574.
59. CHANG, C. C., R. CIUBOTARIU, J. S. MANAVALAN, J. YUAN, A. I. COLOVAI, F. PIAZZA, S. LEDERMAN, M. COLONNA, R. CORTESINI, R. DALLAFAVERA et N. SUCIU-FOCA. 2002. «Tolerization of dendritic cells by T<sub>S</sub> cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4». Nat Immunol, vol. 3, no. 3, p. 237-243.
60. QIN, S. X., M. WISE, S. P. COBBOLD, L. LEONG, Y. C. KONG, J. R. PARNES et H. WALDMANN. 1990. «Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies». Eur J Immunol, vol. 20, no. 12, p. 2737-2745.
61. COBBOLD, S. P., E. ADAMS, S. E. MARSHALL, J. D. DAVIES et H. WALDMANN. 1996. «Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8». Immunol Rev, vol. 149, p. 5-33.
62. QIN, S., S. P. COBBOLD, H. POPE, J. ELLIOTT, D. KIOUSSIS, J. DAVIES et H. WALDMANN. 1993. «"Infectious" transplantation tolerance». Science, vol. 259, no. 5097, p. 974-977.
63. GRACA, L., S. P. COBBOLD et H. WALDMANN. 2002. «Identification of regulatory T cells in tolerated allografts». J Exp Med, vol. 195, no. 12, p. 1641-1646.

64. DAVIES, J. D., E. O'CONNOR, D. HALL, T. KRAHL, J. TROTTER et N. SARVETNICK. 1999. «CD4<sup>+</sup> CD45RB low-density cells from untreated mice prevent acute allograft rejection». J Immunol, vol. 163, no. 10, p. 5353-5357.
65. KINGSLEY, C. I., M. KARIM, A. R. BUSHELL et K. J. WOOD. 2002. «CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses». J Immunol, vol. 168, no. 3, p. 1080-1086.
66. TAYLOR, P. A., C. J. LEES et B. R. BLAZAR. 2002. «The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality». Blood, vol. 99, no. 10, p. 3493-3499.
67. HOFFMANN, P., J. ERMANN, M. EDINGER, C. G. FATHMAN et S. STROBER. 2002. «Donor-type CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation». J Exp Med, vol. 196, no. 3, p. 389-399.
68. DIECKMANN, D., C. H. BRUETT, H. PLOETTNER, M. B. LUTZ et G. SCHULER. 2002. «Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells». J Exp Med, vol. 196, no. 2, p. 247-253.
69. ZHENG, S. G., J. H. WANG, J. D. GRAY, H. SOUCIER et D. A. HORWITZ. 2004. «Natural and induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells educate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF- $\beta$ , and IL-10». J Immunol, vol. 172, no. 9, p. 5213-5221.
70. CLAVERIE, J. M., A. PROCHNICKA-CHALUFOUR et L. BOUGUELERET. 1989. «Implications of a Fab-like structure for the T-cell receptor». Immunol Today, vol. 10, no. 1, p. 10-14.
71. BENTLEY, G. A. et R. A. MARIUZZA. 1996. «The structure of the T cell antigen receptor». Annu Rev Immunol, vol. 14, p. 563-590.
72. EPEL, M., J. D. ELLENHORN, D. J. DIAMOND et Y. REITER. 2002. «A functional recombinant single-chain T cell receptor fragment capable of selectively targeting antigen-presenting cells». Cancer Immunol Immunother, vol. 51, no. 10, p. 565-573.
73. LANZAVECCHIA, A., G. LEZZI et A. VIOLA. 1999. «From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior». Cell, vol. 96, no. 1, p. 1-4.
74. NGUYEN, P., I. MOISINI et T. L. GEIGER. 2003. «Identification of a murine CD28 dileucine motif that suppresses single-chain chimeric T-cell receptor expression and function». Blood, vol. 102, no. 13, p. 4320-4325.

75. ESHHAR, Z. 1997. «Tumor-specific T-bodies: towards clinical application». Cancer Immunol Immunother, vol. 45, no. 3-4, p. 131-136.
76. BIRD, R. E., K. D. HARDMAN, J. W. JACOBSON, S. JOHNSON, B. M. KAUFMAN, S. M. LEE, T. LEE, S. H. POPE, G. S. RIORDAN et M. WHITLOW. 1988. «Single-chain antigen-binding proteins». Science, vol. 242, no. 4877, p. 423-426.
77. HUSTON, J. S., D. LEVINSON, M. MUDGETT-HUNTER, M. S. TAI, J. NOVOTNY, M. N. MARGOLIES, R. J. RIDGE, R. E. BRUCCOLERI, E. HABER, R. CREA et H. OPPERMAN. 1988. «Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 85, no. 16, p. 5879-5883.
78. MORITZ, D. et B. GRONER. 1995. «A spacer region between the single chain antibody- and the CD3  $\zeta$ -chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity». Gene Ther, vol. 2, no. 8, p. 539-546.
79. PATEL, S. D., M. MOSKALENKO, D. SMITH, B. MASKE, M. H. FINER et J. G. MCARTHUR. 1999. «Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function». Gene Ther, vol. 6, no. 3, p. 412-419.
80. CHAN, A. C., B. A. IRVING et A. WEISS. 1992. «New insights into T-cell antigen receptor structure and signal transduction». Curr Opin Immunol, vol. 4, no. 3, p. 246-251.
81. WEISS, A. et D. R. LITTMAN. 1994. «Signal transduction by lymphocyte antigen receptors». Cell, vol. 76, no. 2, p. 263-274.
82. WEISS, A. 1993. «T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases». Cell, vol. 73, no. 2, p. 209-212.
83. HOMBACH, A., C. HEUSER et H. ABKEN. 2002. «The recombinant T cell receptor strategy: insights into structure and function of recombinant immunoreceptors on the way towards an optimal receptor design for cellular immunotherapy». Curr Gene Ther, vol. 2, no. 2, p. 211-226.
84. ALTENSCHMIDT, U., E. KLUNDT et B. GRONER. 1997. «Adoptive transfer of *in vitro*-targeted, activated T lymphocytes results in total tumor regression». J Immunol, vol. 159, no. 11, p. 5509-5515.
85. ESHHAR, Z., T. WAKS, G. GROSS et D. G. SCHINDLER. 1993. «Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the  $\gamma$  or  $\zeta$  subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 90, no. 2, p. 720-724.

86. HOMBACH, A., A. WIECZARKOWIECZ, T. MARQUARDT, C. HEUSER, L. USAI, C. POHL, B. SELIGER et H. ABKEN. 2001. «Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3  $\zeta$  signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3  $\zeta$  signaling receptor molecule». J Immunol, vol. 167, no. 11, p. 6123-6131.
87. KRAUSE, A., H. F. GUO, J. B. LATOUCHE, C. TAN, N. K. CHEUNG et M. SADELAIN. 1998. «Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes». J Exp Med, vol. 188, no. 4, p. 619-626.
88. NUNES, J. A., A. TRUNEH, D. OLIVE et D. A. CANTRELL. 1996. «Signal transduction by CD28 costimulatory receptor on T cells. B7-1 and B7-2 regulation of tyrosine kinase adaptor molecules». J Biol Chem, vol. 271, no. 3, p. 1591-1598.
89. FINNEY, H. M., A. D. LAWSON, C. R. BEBBINGTON et A. N. WEIR. 1998. «Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product». J Immunol, vol. 161, no. 6, p. 2791-2797.
90. CLAVREUL, A., S. FISSON, L. D'HELLENCOURT C et D. COUEZ. 2000. «Interrelationship between CD3 and CD28 pathways in a murine T cell thymoma». Mol Immunol, vol. 37, no. 10, p. 571-577.
91. CAI, Z. et J. SPRENT. 1996. «Influence of antigen dose and costimulation on the primary response of CD8<sup>+</sup> T cells in vitro». J Exp Med, vol. 183, no. 5, p. 2247-2257.
92. MAHER, J., R. J. BRENTJENS, G. GUNSET, I. RIVIERE et M. SADELAIN. 2002. «Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR $\zeta$ /CD28 receptor». Nat Biotechnol, vol. 20, no. 1, p. 70-75.
93. BJORKMAN, P. J., M. A. SAPER, B. SAMRAOUI, W. S. BENNETT, J. L. STROMINGER et D. C. WILEY. 1987. «Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2». Nature, vol. 329, no. 6139, p. 506-512.
94. MIELKE, C., M. TUMMLER, D. SCHUBELER, I. VON HOEGEN et H. HAUSER. 2000. «Stabilized, long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA». Gene, vol. 254, no. 1-2, p. 1-8.
95. DE FELIPE, P. et M. IZQUIERDO. 2000. «Tricistronic and tetracistronic retroviral vectors for gene transfer». Hum Gene Ther, vol. 11, no. 13, p. 1921-1931.
96. METZ, M. Z., A. PICHLER, K. KUCHLER et S. E. KANE. 1998. «Construction and characterization of single-transcript tricistronic retroviral vectors using two internal ribosome entry sites». Somat Cell Mol Genet, vol. 24, no. 1, p. 53-69.

97. FUSSENEGGER, M., X. MAZUR et J. E. BAILEY. 1998. «pTRIDENT, a novel vector family for tricistronic gene expression in mammalian cells». Biotechnol Bioeng, vol. 57, no. 1, p. 1-10.
98. VAGNER, S., B. GALY et S. PYRONNET. 2001. «Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites». EMBO Rep, vol. 2, no. 10, p. 893-898.
99. PESTOVA, T. V., V. G. KOLUPAEVA, I. B. LOMAKIN, E. V. PILIPENKO, I. N. SHATSKY, V. I. AGOL et C. U. HELLEN. 2001. «Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 98, no. 13, p. 7029-7036.
100. JACKSON, R. J. 1988. «RNA translation. Picornaviruses break the rules». Nature, vol. 334, no. 6180, p. 292-293.
101. JANG, S. K., H. G. KRAUSSLICH, M. J. NICKLIN, G. M. DUKE, A. C. PALMENBERG et E. WIMMER. 1988. «A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation». J Virol, vol. 62, no. 8, p. 2636-2643.
102. PELLETIER, J. et N. SONENBERG. 1988. «Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA». Nature, vol. 334, no. 6180, p. 320-325.
103. MARTINEZ-SALAS, E., R. RAMOS, E. LAFUENTE et S. LOPEZ DE QUINTO. 2001. «Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements». J Gen Virol, vol. 82, no. Pt 5, p. 973-984.
104. MACEJAK, D. G. et P. SARNOW. 1991. «Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA». Nature, vol. 353, no. 6339, p. 90-94.
105. NIRULA, A., D. J. MOORE et R. B. GAYNOR. 1997. «Constitutive binding of the transcription factor interleukin-2 (IL-2) enhancer binding factor to the IL-2 promoter». J Biol Chem, vol. 272, no. 12, p. 7736-7745.
106. MATTILA, P. S., K. S. ULLMAN, S. FIERING, E. A. EMMEL, M. MCCUTCHEON, G. R. CRABTREE et L. A. HERZENBERG. 1990. «The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes». Embo J, vol. 9, no. 13, p. 4425-4433.
107. DURAND, D. B., J. P. SHAW, M. R. BUSH, R. E. REPLOGLE, R. BELAGAJE et G. R. Crabtree. 1988. «Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer». Mol Cell Biol, vol. 8, no. 4, p. 1715-1724.

108. FINCH, R. J., P. E. FIELDS et P. D. GREENBERG. 2001. «A transcriptional block in the IL-2 promoter at the -150 AP-1 site in effector CD8<sup>+</sup> T cells». J Immunol, vol. 166, no. 11, p. 6530-6536.
109. BARBEAU, B., G. A. ROBICHAUD, J. F. FORTIN et M. J. TREMBLAY. 2001. «Negative regulation of the NFAT1 factor by CD45: implication in HIV-1 long terminal repeat activation». J Immunol, vol. 167, no. 5, p. 2700-2713.
110. ROONEY, J. W., Y. L. SUN, L. H. GLIMCHER et T. HOEY. 1995. «Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation». Mol Cell Biol, vol. 15, no. 11, p. 6299-6310.
111. FIORENTINO, D. F., M. W. BOND et T. R. MOSMANN. 1989. «Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones». J Exp Med, vol. 170, no. 6, p. 2081-2095.
112. MOORE, K. W., R. DE WAAL MALEFYT, R. L. COFFMAN et A. O'GARRA. 2001. «Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor». Annu Rev Immunol, vol. 19, p. 683-765.
113. GROUX, H., M. BIGLER, J. E. DE VRIES et M. G. RONCAROLO. 1996. «Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4<sup>+</sup> T cells». J Exp Med, vol. 184, no. 1, p. 19-29.
114. KUHN, R., J. LOHLER, D. RENNICK, K. RAJEWSKY et W. MULLER. 1993. «Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis». Cell, vol. 75, no. 2, p. 263-274.
115. DING, Y., L. QIN, S. V. KOTENKO, S. PESTKA et J. S. BROMBERG. 2000. «A single amino acid determines the immunostimulatory activity of interleukin 10». J Exp Med, vol. 191, no. 2, p. 213-224.
116. MOCELLIN, S., M. C. PANELLI, E. WANG, D. NAGORSEN et F. M. MARINCOLA. 2003. «The dual role of IL-10». Trends Immunol, vol. 24, no. 1, p. 36-43.
117. DENHAM, W., D. DENHAM, J. YANG, G. CARTER, S. MACKAY, L. L. MOLDAWER, L. C. CAREY et J. NORMAN. 1998. «Transient human gene therapy: a novel cytokine regulatory strategy for experimental pancreatitis». Ann Surg, vol. 227, no. 6, p. 812-820.
118. MOORE, K. W., P. VIEIRA, D. F. FIORENTINO, M. L. TROUNSTINE, T. A. KHAN et T. R. MOSMANN. 1990. «Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1». Science, vol. 248, no. 4960, p. 1230-1234.

119. SUZUKI, T., H. TAHARA, S. NARULA, K. W. MOORE, P. D. ROBBINS et M. T. LOTZE. 1995. «Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors». J Exp Med, vol. 182, no. 2, p. 477-486.
120. QIN, L., K. D. CHAVIN, Y. DING, H. TAHARA, J. P. FAVARO, J. E. WOODWARD, T. SUZUKI, P. D. ROBBINS, M. T. LOTZE et J. S. BROMBERG. 1996. «Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival». J Immunol, vol. 156, no. 6, p. 2316-2323.
121. ZUO, Z., C. WANG, D. CARPENTER, Y. OKADA, E. NICOLAIDOU, M. TOYODA, A. TRENTO et S. C. JORDAN. 2001. «Prolongation of allograft survival with viral IL-10 transfection in a highly histoincompatible model of rat heart allograft rejection». Transplantation, vol. 71, no. 5, p. 686-691.
122. PAUZA, M. E., H. NEAL, A. HAGENBAUGH, H. CHEROUTRE et D. LO. 1999. «T-cell production of an inducible interleukin-10 transgene provides limited protection from autoimmune diabetes». Diabetes, vol. 48, no. 10, p. 1948-1953.
123. MADSEN, K. 2002. «Combining T cells and IL-10: a new therapy for Crohn's disease?». Gastroenterology, vol. 123, no. 6, p. 2140-2144.
124. SETOGUCHI, K., Y. MISAKI, Y. ARAKI, K. FUJIO, K. KAWAHATA, T. KITAMURA et K. YAMAMOTO. 2000. «Antigen-specific T cells transduced with IL-10 ameliorate experimentally induced arthritis without impairing the systemic immune response to the antigen». J Immunol, vol. 165, no. 10, p. 5980-5986.
125. KING, C., J. DAVIES, R. MUELLER, M. S. LEE, T. KRAHL, B. YEUNG, E. O'CONNOR et N. SARVETNICK. 1998. «TGF- $\beta$ 1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype». Immunity, vol. 8, no. 5, p. 601-613.
126. GORELIK, L. et R. A. FLAVELL. 2000. «Abrogation of TGF $\beta$  signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease». Immunity, vol. 12, no. 2, p. 171-181.
127. MORITANI, M., K. YOSHIMOTO, S. F. WONG, C. TANAKA, T. YAMAOKA, T. SANO, Y. KOMAGATA, J. MIYAZAKI, H. KIKUTANI et M. ITAKURA. 1998. «Abrogation of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice and protection against effector lymphocytes by transgenic paracrine TGF- $\beta$ 1». J Clin Invest, vol. 102, no. 3, p. 499-506.
128. PICCIRILLO, C. A., Y. CHANG et G. J. PRUD'HOMME. 1998. «TGF- $\beta$ 1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice». J Immunol, vol. 161, no. 8, p. 3950-3956.

129. SHULL, M. M., I. ORMSBY, A. B. KIER, S. PAWLOWSKI, R. J. DIEBOLD, M. YIN, R. ALLEN, C. SIDMAN, G. PROETZEL, D. CALVIN, N. ANNUNZIATA et T. DOETSCHMAN. 1992. «Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$  1 gene results in multifocal inflammatory disease». Nature, vol. 359, no. 6397, p. 693-699.
130. GREWAL, I. S., K. D. GREWAL, F. S. WONG, H. WANG, D. E. PICARELLA, C. A. JANEWAY, JR. et R. A. FLAVELL. 2002. «Expression of transgene encoded TGF- $\beta$  in islets prevents autoimmune diabetes in NOD mice by a local mechanism». J Autoimmun, vol. 19, no. 1-2, p. 9-22.
131. SUAREZ-PINZON, W., G. S. KORBUTT, R. POWER, J. HOOTON, R. V. RAJOTTE et A. RABINOVITCH. 2000. «Testicular sertoli cells protect islet  $\beta$ -cells from autoimmune destruction in NOD mice by a transforming growth factor- $\beta$ 1-dependent mechanism». Diabetes, vol. 49, no. 11, p. 1810-1818.
132. BRUNNER, A. M., H. MARQUARDT, A. R. MALACKO, M. N. LIOUBIN et A. F. PURCHIO. 1989. «Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor  $\beta$  1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins». J Biol Chem, vol. 264, no. 23, p. 13660-13664.
133. SIME, P. J., Z. XING, F. L. GRAHAM, K. G. CSAKY et J. GAULDIE. 1997. «Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- $\beta$ 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung». J Clin Invest, vol. 100, no. 4, p. 768-776.
134. LYONS, R. M., J. KESKI-OJA et H. L. MOSES. 1988. «Proteolytic activation of latent transforming growth factor- $\beta$  from fibroblast-conditioned medium». J Cell Biol, vol. 106, no. 5, p. 1659-1665.
135. HYYTIAINEN, M., C. PENTTINEN et J. KESKI-OJA. 2004. «Latent TGF- $\beta$  binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF- $\beta$  activation». Crit Rev Clin Lab Sci, vol. 41, no. 3, p. 233-264.
136. SAHARINEN, J., M. HYYTIAINEN, J. TAIPALE et J. KESKI-OJA. 1999. «Latent transforming growth factor- $\beta$  binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF- $\beta$  action». Cytokine Growth Factor Rev, vol. 10, no. 2, p. 99-117.
137. BRANTON, M. H. et J. B. KOPP. 1999. «TGF- $\beta$  and fibrosis». Microbes Infect, vol. 1, no. 15, p. 1349-1365.
138. SANVITO, F., A. NICHOLS, P. L. HERRERA, J. HUARTE, A. WOHLWEND, J. D. VASSALLI et L. ORCI. 1995. «TGF- $\beta$  1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF- $\alpha$ , triggers insulin-dependent diabetes». Biochem Biophys Res Commun, vol. 217, no. 3, p. 1279-1286.

139. LEE, M. S., D. GU, L. FENG, S. CURRIDEN, M. ARNUSH, T. KRAHL, D. GURUSHANTHAIAN, C. WILSON, D. L. LOSKUTOFF, H. FOX et N. SARVETNICK. 1995. «Accumulation of extracellular matrix and developmental dysregulation in the pancreas by transgenic production of transforming growth factor- $\beta$  1». Am J Pathol, vol. 147, no. 1, p. 42-52.
140. TAKEBE, Y., M. SEIKI, J. FUJISAWA, P. HOW, K. YOKITA, K. ARAI, M. YOSHIDA et N. ARAI. 1988. «SR  $\alpha$  promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat». Mol Cell Biol, vol. 8, no. 1, p. 466-472
141. HO, S. N., H. D. HUNT, R. M. HORTON, J. K. PULLEN et L. R. PEASE. 1989. «Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction». Gene, vol. 77, no. 1, p. 51-59.
142. SANGER, F., S. NICKLEN et A. R. COULSON. 1992. «DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977». Biotechnology, vol. 24, p. 104-108.
143. LAROCQUE, Sylvie. 2004. «Criblage de molécules apoptotiques à des allogreffes». Mémoire de maîtrise, Laval, INRS-Institut Armand-Frappier, 77p.
144. VERWEIJ, C. L., C. GUIDOS et G. R. CRABTREE. 1990. «Cell type specificity and activation requirements for NFAT-1 (nuclear factor of activated T-cells) transcriptional activity determined by a new method using transgenic mice to assay transcriptional activity of an individual nuclear factor». J Biol Chem, vol. 265, no. 26, p. 15788-15795.
145. SCHLAAK, J. F., E. SCHMITT, C. HULS, K. H. MEYER ZUM BUSCHENFELDE et B. FLEISCHER. 1994. «A sensitive and specific bioassay for the detection of human interleukin-10». J Immunol Methods, vol. 168, no. 1, p. 49-54.
146. BORSET, M., A. WAAGE et A. SUNDAN. 1996. «Hepatocyte growth factor reverses the TGF- $\beta$ -induced growth inhibition of CCL-64 cells. A novel bioassay for HGF and implications for the TGF- $\beta$  bioassay». J Immunol Methods, vol. 189, no. 1, p. 59-64.
147. SAUVE, D., M. BARATIN, C. LEDUC, K. BONIN et C. DANIEL. 2004. «Alloantibody production is regulated by CD4<sup>+</sup> T cells' alloreactive pathway, rather than precursor frequency or Th1/Th2 differentiation». Am J Transplant, vol. 4, no. 8, p. 1237-1245.
148. MOMBAERTS, P., A. R. CLARKE, M. A. RUDNICKI, J. IACOMINI, S. ITOHARA, J. J. LAFAILLE, L. WANG, Y. ICHIKAWA, R. JAENISCH, M. L. HOOPER et S. TONEGAWA. 1992. «Mutations in T-cell antigen receptor genes  $\alpha$  and  $\beta$

block thymocyte development at different stages». Nature, vol. 360, no. 6401, p. 225-231.

149. JIA, S. H., Z. KUREPA, A. BAI et J. FORMAN. 2000. «Comparative ability of Qdm/Qa-1<sup>b</sup>, k<sup>b</sup>, and D<sup>b</sup> to protect class I<sup>low</sup> cells from NK-mediated lysis in vivo». J Immunol, vol. 165, no. 11, p. 6142-6147.

150. DE BAETSELIER, P., E. ROOS, D. VAN HECKE, L. VERSCHAEVE, L. BRYNS et H. VERSCHUEREN. 1988. «Syngeneic in vivo passage of the murine BW 5147 lymphoma results in the expression of a stable metastatic phenotype». Int J Cancer, vol. 41, no. 5, p. 720-726.

151. VANDENDRIESSCHE, T., A. GELDHOF, M. BAKKUS, D. TOUSSAINT-DEMYLLE, L. BRIJS, K. THIELEMANS, H. VERSCHUEREN et P. DE BAETSELIER. 1994. «Metastasis of mouse T lymphoma cells is controlled by the level of major histocompatibility complex class I H-2D<sup>k</sup> antigens». Int J Cancer, vol. 58, no. 2, p. 217-225.

#### **ADRESSES INTERNET**

*Statistiques québécoises sur le don d'organe 2003, Québec-Transplant*

<http://www.quebec-transplant.qc.ca/public.htm>