

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Ciblage de molécules apoptotiques à des allogreffes

Par
Sylvie Larocque

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	Alain Piché, Université de Sherbrooke
Directeur de recherche	François Denis, INRS-Institut Armand Frappier

RÉSUMÉ

Les sites immunoprivilégiés sont protégés du système immunitaire, grâce en partie à l'expression de FasL qui induit l'apoptose des cellules T auto-réactives pénétrant ces sites. En ciblant spécifiquement FasL à des allogreffes, il serait possible de créer de sites immunoprivilégiés artificiels pour permettre l'acceptation de greffes sans l'usage d'immunosuppresseurs. Ce projet de Maîtrise consistait à générer des molécules apoptotiques capable de cibler spécifiquement des allogreffes afin de les protéger du système immunitaire.

Un anticorps spécifique aux CMH I des souris donneuses utilisées dans un modèle de rejet d'allogreffe a été produit et des scFvs de différente valence ont été générés à partir de cet anticorps. Il a été démontré que l'expression basale de ce scFv était toxique aux bactéries car le promoteur du vecteur d'origine était fuyant. Il s'est aussi avéré que le peptide signal présent sur ce vecteur était inefficace pour l'expression périplasmique et menait à l'accumulation en corps d'inclusions. La construction de différents vecteurs a permis d'obtenir un rendement supérieur.

L'utilisation d'oligonucléotides dégénérés lors de l'amplification par PCR des chaînes variables du scFv B8-24-3 a mené à la substitution d'acides aminés affectant la stabilité du scFv. La réintroduction de la séquence germinale a permis d'augmenter le rendement. Les scFvs stabilisés ont été fusionnés à la portion extracellulaire de FasL et transfectés en cellules eucaryotes rendues résistantes à l'apoptose grâce à l'expression d'un mutant dominant négatif de FADD généré lors de ce projet.

L'oligomérisation de FasL étant essentielle à son activité biologique, deux moyens ont été préconisés pour son oligomérisation, soit l'altération de la valence du scFv et l'usage d'un motif de trimérisation. Des tests d'apoptose ont confirmé l'activité apoptotique des chimères. Des analyses restent à être effectuées afin d'évaluer le degré d'oligomérisation du FasL recombinant produit. Les outils nécessaires sont disponibles afin de procéder aux analyses *in vitro* et éventuellement évaluer le potentiel de ces molécules pour induire l'immunoprivilège artificiel *in vivo*.

Étudiante

Sylvie Larocque



Directeur de Maîtrise

Dr François Denis



REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de Maîtrise, le Dr François Denis, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire lors de mon premier stage, ce qui m'a conduit à cette Maîtrise. Merci François pour l'enseignement que tu m'as donné et les nombreuses idées qui ont rendu ce projet intéressant. Merci à tous les membres du laboratoire, Martin, Louis, Geneviève et Véronique pour tous les bons moments passés dans notre petit laboratoire à apprendre à maximiser et partager le peu d'espace disponible. Je voudrais particulièrement remercier Louis et Martin, qui répondaient sans cesse à mes questions parce que Martin et Louis savent tout tout tout !!!

Je voudrais aussi remercier tous les gens de l'IAF qui ont contribué à faire avancer mon projet ainsi que ceux qui ont rendu mon séjour agréable que ce soit durant le dîner, pour les discussions dans le couloir, les parties de hockey et de Frisbee ou toutes les activités annuelles de l'AGEIAF qui ont fait de mon séjour à l'IAF un endroit plaisant et divertissant.

Je ne peux passer sous silence l'encouragement et l'amour que j'ai su trouver en toi durant ces deux années de maîtrise: Merci Jean-Guy.

Mes derniers et plus sincères remerciements vont à ma famille qui m'ont encouragé durant toutes mes études. Particulièrement, mon inséparable sœur Suzie qui m'a accompagné encore une fois durant cette belle étape de ma vie. À mes parents, pour le support constant (financièrement et psychologiquement), je vous dis merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné l'opportunité de me rendre jusqu'à la fin de ma Maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS.....	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
INTRODUCTION	1
1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
1.1 Transplantation et rejet.....	2
1.2 Le suicide cellulaire programmé	3
1.2.1 Définition de l'apoptose.....	3
1.2.2 Le récepteur de mort Fas et son ligand	3
1.2.3 Les protéases apoptotiques	6
1.2.4 Apoptose et système immunitaire.....	6
1.2.5 Les sites immunoprivilégiés	7
1.3 Anticorps et molécules dérivées.....	9
1.3.1 Description et caractéristiques	9
1.3.2 Utilisation des anticorps en immunothérapie.....	9
1.3.3 Fragments d'anticorps et anticorps simple-chaîne.....	10
1.3.4 Multimérisation d'anticorps simple-chaîne	11
1.3.5 Production d'anticorps simple-chaîne.....	12
1.4 Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.....	13
1.5 Projet de recherche.....	14
2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	15
2.1 Souches bactériennes utilisées.....	15
2.2 Tampons et milieux utilisés.....	15
2.3 Vecteurs utilisés.....	18
2.3.1 Vecteurs SR α puroMCS1 et SR α hygroMCS1	18
2.3.2 Vecteur pCR4Blunt-TOPO	19
2.3.3 Vecteur pDisplay	19
2.3.4 Vecteur pCANTAB 5E	20
2.3.5 Vecteur pLEX	20
2.4 Clonage d'ADN	21
2.4.1 Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc.....	21
2.4.2 Réaction de polymérase en chaîne	22
2.4.3 Extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol	22
2.4.4 Manipulations d'extrémités d'ADN	22
2.4.5 Clonage de fragments d'ADN	23
2.4.6 Clonage d'oligonucléotides	23

2.4.7 Gels d'agarose analytiques	24
2.4.8 Purification d'ADN sur gel.....	24
2.4.9 Transformation bactérienne	25
2.4.10 Criblage de clones recombinants	26
2.4.11 Préparation d'ADN à grande échelle et séquençage.....	26
2.5 Production d'anticorps et de scFvs	27
2.5.1 Production d'anticorps	27
2.5.2 Production de scFvs avec pCANTAB	28
2.5.3 Production de scFvs avec pLEX.....	28
2.5.4 Purification de scFvs.....	29
2.5.5 Analyse protéique	29
2.6 Culture cellulaire	30
2.6.1 Lignées cellulaires utilisées	30
2.6.2 Transfections stables	31
2.6.3 Analyse en cytométrie en flux	31
2.6.4 Sélection de cellules résistantes à l'apoptose.....	32
2.6.5 Microscopie à fluorescence.....	32
3. RÉSULTATS	33
3.1 Clonage et transfection des molécules du CMH I.....	33
3.2 Confirmation de la spécificité de l'anticorps B8-24-3	36
3.3 Clonage et expression de scFv dans le vecteur pCANTAB 5E	37
3.4 Génération de scFvs de valence différente.....	43
3.5 Construction du vecteur pCANTAB 6H et clonage des scFvs.....	45
3.6 Augmentation de la stabilité des scFvs.....	46
3.7 Clonage des scFvs dans le vecteur pLEX.....	49
3.8 Production de scFvs en bactéries.....	50
3.9 Construction d'un vecteur pour expression en cellules eucaryotes.....	51
3.10 Génération de cellules résistantes à l'apoptose	53
3.11 Expression des chimères scFv-FasL en cellules eucaryotes	56
3.12 Génération de FasL recombinant trimérique	56
4. DISCUSSION	59
4.1 Sélection d'un anticorps et génération d'un scFv	59
4.2 Optimisation du système de production de scFvs	61
4.3 Influence de la stabilité des scFvs sur leur rendement	63
4.4 Construction de chimères scFv-FasL.....	66
4.5 Induction d'immunoprivilège artificiel.....	67
5. CONCLUSION.....	69
6. BIBLIOGRAPHIE.....	71

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Induction de l'apoptose via le récepteur Fas	5
Figure 2. Représentation schématique d'un anticorps IgG	8
Figure 3. Représentation des fragments d'anticorps.....	10
Figure 4. Influence de la charnière sur la valence des scFvs	12
Figure 5. Représentation d'une molécule du CMH I.....	13
Figure 6. Représentation du vecteur SR α puroMCS1	18
Figure 7. Représentation du vecteur pCR4Blunt-TOPO	19
Figure 8. Représentation du vecteur pDisplay	19
Figure 9. Représentation du vecteur pCANTAB 5E	20
Figure 10. Représentation du vecteur pLEX.....	21
Figure 11. Séquence N-terminale du CMH I H-2D ^k	34
Figure 12. Analyse par FACS de la spécificité de l'anticorps B8-24-3.....	35
Figure 13. Évaluation de l'expression de H2-D ^b par RT-PCR	36
Figure 14 a. Séquence de la région VL de l'anticorps B8-24-3.....	38
Figure 14 b. Séquence de la région VH de l'anticorps B8-24-3	38
Figure 15. Principe de l'assemblage par PCR des scFvs	39
Figure 16. Délétion observée chez les scFvs dans pCANTAB 5E	40
Figure 17. Introduction d'un site <i>FseI</i> dans pCANTAB 5E	41
Figure 18. Analyse de l'expression des scFvs par immunobuvardage	43
Figure 19. Mutations C-terminales du scFv trivalent	44
Figure 20. Représentation du vecteur pCANTAB 6H	45
Figure 21. Mutations introduites chez les scFvs par les amorces dégénérées	46
Figure 22. Introduction des séquences génomiques dans les scFvs.....	47
Figure 23. Influence de l'optimisation sur le rendement en scFv	48
Figure 24. Séquence du peptide signal dans pCANTAB 5E et 6H	49
Figure 25. Rendement comparatif de scFvs entre pCANTAB 6H et pLEX.....	50
Figure 26. Identification des fractions contenant le scFv purifié.....	51
Figure 27. Séquence de la charnière unissant les scFvs à FasL.....	51
Figure 28. Analyse par RT-PCR de l'expression de FADDdn.....	54
Figure 29. Analyse microscopique de l'expression des chimères scFv-FasL	55
Figure 30. Structure du Leucine Zipper et de l'Isoleucine Zipper.....	57
Figure 31. Introduction d'un domaine Isoleucine Zipper	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Génotype des souches bactériennes utilisées.....	15
Tableau II. Tampons utilisés pour la manipulation d'acides nucléiques	15
Tableau III. Composition des milieux et tampons utilisés.....	16
Tableau IV. Liste des oligonucléotides utilisés	17

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AICD	Activation-induced Cell Death
APS	Persulfate d'Ammonium
ARN	Acide Ribonucléique
ARNt	Acide Ribonucléique de transfert
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Triphosphate
BSA	Albumine Sérique Bovine
CAD	C-terminal autocatalytic domain
CDR	Complementary Determining Region
CIP	Phosphatase alcaline d'intestin de veau
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DED	Domaine effecteur de mort
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTPs	Désoxyribonucléotides Triphosphates
DTT	Dithiothréitol
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Éthylène-diaminetétraacétique
FACS	Trieur de cellules activé par fluorescence
FADD	Fas Associate Death Domain
FasL	Ligand de Fas
FITC	Isothiocyanate de Fluorescéine
h	Heure
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine Éthanesulfonique
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ig	Immunoglobuline

IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactoside
IZ	Domaine Isoleucine Zipper
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
min	Minutes
MMP	Métalloprotéinase de la matrice
MOPS	Acide 3-N-morpholinopropane sulfonique
NEB	New England Biolabs
pb	Nombres de Paires de Bases
PBS	Tampon Phosphate Salin
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
pmol	picomole
psi	Livres par pouce carré
PVDF	Difluorure de Polyvinylidène
scFv	Anticorps simple chaîne
SDS	Dodécylsulfate de Sodium
sec	Seconde
sFasL	Fas ligand soluble
SVF	Sérum de veau Foetal
TAE	Tampon Tris-Acétate-EDTA
TBE	Tampon Tris-Borate-EDTA
TBS	Tampon Tris-Salin
TBST	Tampon Tris-Salin-Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV	Rayons Ultraviolets
V	Volts
VH	Région Variable de la Chaîne Lourde
VL	Région Variable de la Chaîne Légère

INTRODUCTION

Les greffes d'organes sont devenues une pratique courante qui demeure le seul recours pour les personnes ayant perdu un organe vital. L'année dernière au Québec, 432 greffes d'organes ont été effectuées et près de 1000 personnes sont toujours en attente d'une greffe. Le manque de donneurs et les barrières immunologiques explique cette longue liste d'attente. Les immunosuppresseurs ont grandement amélioré la survie des organes greffés sans toutefois empêcher le rejet chronique. La prise d'immunosuppresseurs rend aussi l'hôte vulnérable aux infections et au cancer.

Le corps humain possède des sites dits immunoprivilégiés qui donnent un accès restreint aux cellules du système immunitaire. Bien que ces barrières résultent d'un ensemble de mécanismes, il a été démontré que l'expression de FasL était indispensable pour maintenir l'immunoprivilège des yeux et des testicules. Cette molécule agit en induisant l'apoptose des cellules T auto-réactives pénétrant ces sites. La puissance de l'immunoprivilège oculaire est illustrée par le succès des greffes de cornées qui sont acceptées sans usage d'immunosuppresseurs malgré l'incompatibilité entre donneurs et receveurs.

Le but de ce travail était de créer des sites immunoprivilégiés artificiels en ciblant FasL à des allogreffes pour induire la mort sélective des cellules T alloréactives. Cette approche a été utilisée dans des modèles murins par des techniques de transgénèse, une thérapie clairement non applicable chez l'humain. La méthode préconisée consistait à induire la liaison de FasL aux greffons par un traitement avec des chimères constituées de FasL et d'un anticorps simple-chaîne spécifique aux molécules du greffon. Le choix de l'anticorps a été basé sur un modèle murin de rejet de greffe qui permet l'étude de l'alloréactivité directe et indirecte. Dans ce modèle, les souris donneuses expriment les CMH I D^b, D^p, K^b et K^p alors que les souris receveuses expriment les CMH I K^k et D^k. Un anticorps spécifique aux haplotypes b et p a été choisi pour construire les chimères qui seront utilisées *in vivo*.

1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Transplantation et rejet

La transplantation d'organe demeure la seule possibilité de survie pour les individus souffrant de la perte d'un organe vital. Le développement d'immunosuppresseurs puissants a rendu la transplantation possible, mais le prix associé à la prise de ceux-ci inclut une susceptibilité accrue aux infections et au cancer. Malgré les succès obtenus en transplantation, l'acceptation définitive demeure encore impossible, à l'exception de greffes de cornée. Le rejet a lieu suite à la reconnaissance d'antigènes du greffon (allo-reconnaissance) et les trois formes majeures de rejet sont nommées hyper-aiguë, aiguë et chronique. Le rejet hyper-aigu est problématique dans le cas de xéno-greffes de porc [38], mais n'est pas un obstacle chez les allogreffes sauf si le récipiendaire possède des anticorps dirigés contre les CMH du donneur, ce qui arrive chez les individus ayant subi des greffes répétées [61]. Le rejet aigu a lieu suite à la reconnaissance immunitaire de peptides du non-soi présentés par les molécules du CMH du donneur ou du récipiendaire et ceci peut être contrôlé avec des immunosuppresseurs [8]. Le rejet chronique demeure inévitable et a lieu des mois à des années suite à la transplantation et ce, malgré la prise continue d'immunosuppresseurs. Il a été proposé que le rejet chronique soit le résultat d'épisodes récurrents de rejet aigu [44]. Les effecteurs principaux du rejet sont les lymphocytes T qui reconnaissent les antigènes étrangers présentés par les molécules du CMH de classe-I ou de classe-II des cellules présentatrices d'antigènes [8; 44].

Dans le rejet, deux formes de présentation antigénique existent, soit la reconnaissance directe ou indirecte. La présentation directe serait d'importance majeure dans le rejet aigu et a lieu lorsque les molécules du CMH de classe-I ou de classe-II du donneur sont respectivement reconnues par les cellules T CD8⁺ ou CD4⁺ de l'hôte [114]. La présentation indirecte serait plus importante dans le rejet chronique [17] et a lieu lorsque les cellules T CD4⁺ de l'hôte reconnaissent des peptides issus du greffon qui sont présentés par les molécules du CMH de classe-II du receveur [113]. Étant donné l'importance de ces deux voies de présentation dans le rejet d'organe, il est critique que les nouvelles thérapies soient évaluées dans un modèle permettant de tenir compte de leur contribution respective. Bien que les cellules T cytotoxiques CD8⁺ soient importantes pour la destruction d'allogreffes [110], les cellules CD4⁺ sont essentielles pour le rejet car les souris déficientes en cellules CD8⁺ peuvent

effectuer le rejet, alors que les souris déficientes en cellules CD4⁺ ne le peuvent pas [72]. Les cellules T utilisent deux mécanismes pour induire l'apoptose des allogreffes, soit la degranulation de cellules T cytotoxiques CD8⁺ avec libération de perforine et de granzymes [127] ou l'engagement du récepteur Fas par son ligand (FasL) exprimé par les cellules T CD8⁺ ou CD4⁺ [90].

1.2 Le suicide cellulaire programmé

1.2.1 Définition de l'apoptose

La mort d'une cellule peut se produire de deux manières: la nécrose ou l'apoptose. La nécrose survient lorsqu'une cellule subit un dommage extrême. Cette mort non contrôlée mène à l'éclatement de la cellule et la libération du contenu intracellulaire dans le milieu environnant, ce qui induit une réponse inflammatoire causant des dommages aux tissus environnants. L'apoptose est un processus physiologique normal qui se traduit par des changements morphologiques et biochimiques menant à la mort cellulaire. Les changements morphologiques caractéristiques d'une cellule apoptotique sont la condensation de la chromatine et du cytoplasme suivit de la fragmentation de la cellule en vésicules nommées corps apoptotiques. Lors de l'apoptose, l'ADN chromosomique est clivé en fragments nucléosomaux de 180 pb suite à l'activation de l'endonucléase apoptotique CAD. Les cellules apoptotiques subissent une perte d'asymétrie membranaire, ce qui mène à l'exposition de résidus phosphatidylsérines à la membrane plasmique externe permettant la reconnaissance par les phagocytes. Puisque l'intégrité membranaire des cellules apoptotiques est préservée, le contenu intracellulaire n'est pas relâché dans le milieu, ce qui fait de l'apoptose un processus non-inflammatoire. L'apoptose est essentielle au développement embryonnaire et joue un rôle prépondérant lors de la sélection thymique du répertoire de cellules T. Puisque les lymphocytes T peuvent subir une expansion clonale massive, l'apoptose joue aussi un rôle clef dans l'homéostasie du système immunitaire et les récepteurs de morts sont essentiels à ceci.

1.2.2 Le récepteur de mort Fas et son ligand

Les récepteurs de morts (Fas, TNF-R1, TRAMP, TRAIL-R1, TRAIL-R2 et DR6) forment un sous-groupe de la famille du récepteur du TNF. Ce sont des récepteurs membranaires de type I possédant une portion extracellulaire composée de domaines immunoglobulines qui transmettent le signal apoptotique suite à la liaison à leur

ligand respectif [4]. Les récepteurs de mort possèdent un domaine d'interaction protéine-protéine nommé domaine de mort dans leur queue cytoplasmique. Cette région permet le recrutement séquentiel de protéines qui mène à l'activation de la cascade apoptotique. Le récepteur Fas est une protéine transmembranaire de 45 kDa exprimée chez une grande variété de cellules avec une plus forte expression dans le cœur, les poumons et le foie [130]. Puisque les hépatocytes expriment un niveau élevé de Fas, ces cellules sont très sensibles à l'apoptose induite par l'engagement du récepteur. En effet, l'administration à des souris d'un anticorps dirigé contre Fas mène à une hépatite létale [95; 106].

Le ligand de Fas (FasL) est une protéine de 40 kDa qui est membre de la famille du TNF. Comme les autres membres de cette famille, FasL est une protéine membranaire de type II qui existe sous forme trimérique. Contrairement à son récepteur, l'expression de FasL est limitée à certains types cellulaires. FasL est principalement exprimé chez les cellules du système immunitaire comme les cellules T, les cellules NK et les macrophages. Certains tissus immunoprivilégiés expriment FasL de manière constitutive et cette expression participe à maintenir l'état d'immunoprivilège de ces sites [7; 42]. FasL peut être relâché dans le milieu sous une forme associée à des microvésicules ou sous forme soluble (sFasL). Lorsqu'associé aux microvésicules, FasL se retrouve sous forme entière et conserve son pouvoir apoptotique [83]. La forme soluble de FasL, est constituée de la portion extracellulaire de FasL qui reste associée sous forme de trimère [126]. Ce FasL soluble est relâché suite à l'action de la métalloprotéinase matrilysine (MMP-7) [60; 82; 104].

Des études ont démontré que sFasL homotrimérique possède un faible pouvoir apoptotique, suggérant qu'il agit en tant que régulateur négatif [116; 125]. Des études utilisant des inhibiteurs de MMP ou des mutants non clivables de FasL viennent appuyer un rôle de régulateur négatif, puisque l'effet apoptotique de FasL est augmenté lorsque le clivage de FasL est inhibé [68]. Contrairement aux anticorps multimériques dirigés contre Fas, l'administration de sFasL n'est pas létal aux souris et les hépatocytes présentent une morphologie normale [116]. Même si sFasL possède peu d'activité intrinsèque, l'agrégation de sFasL par le biais d'anticorps permet de restaurer son activité *in vitro* et la co-administration de sFasL avec un anticorps permettant son oligomérisation devient létal aux souris [116]. Ceci indique que la

seule trimérisation de Fas est insuffisante pour induire l'apoptose et une oligomérisation est requise pour ceci. Ainsi, il serait possible d'utiliser du FasL soluble de manière systémique sans effet hépatique indésirable si son oligomérisation peut être induite de manière spécifique au niveau de l'organe ciblé.

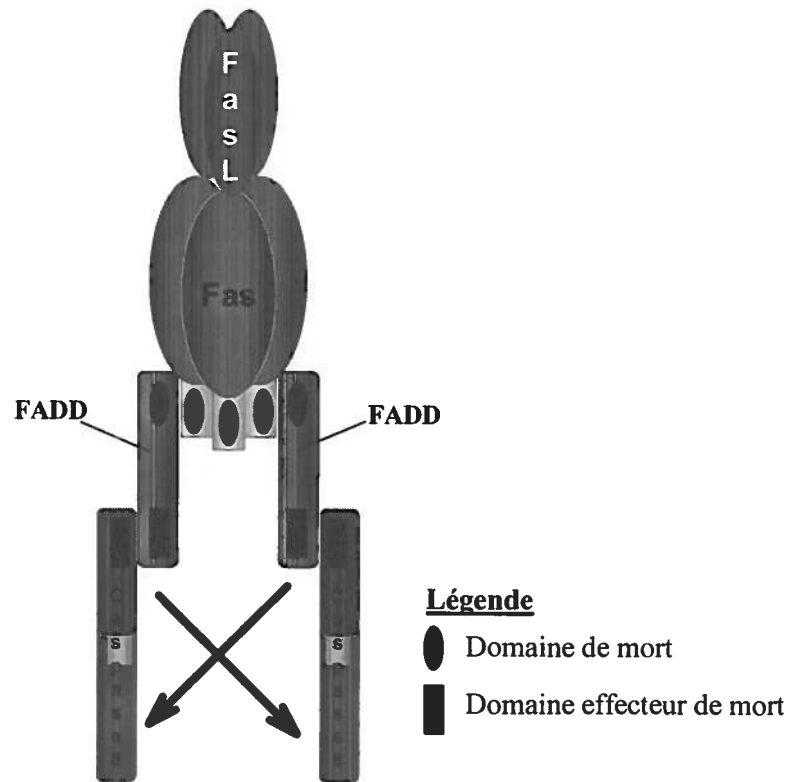


Figure 1. Induction de l'apoptose via le récepteur Fas

La liaison de FasL induit l'aggrégation du récepteur Fas et le recrutement de la protéine adaptatrice FADD. Cette dernière possède un DED qui assure le recrutement de la pro-caspase 8 via son propre DED. Le rapprochement des pro-caspases 8 permet leur activation par catalyse croisée et l'initiation de l'apoptose.

La Figure 1 illustre les événements qui surviennent suite à l'engagement de Fas par FasL. La liaison de FasL induit l'aggrégation de Fas et la formation d'un complexe multi-protéique nommé DISC (Death-Inducing Signaling Complex) qui mènera la cellule vers l'apoptose [102]. Une des protéines recrutées au niveau du DISC est la protéine adaptatrice FADD qui possède un domaine de mort C-terminal homologue à celui de Fas permettant leur association respective [15; 23]. FADD possède un autre domaine d'interaction protéine-protéine nommé domaine effecteur de mort (DED). Le

DED de FADD permet de recruter la pro-caspase-8 qui possède dans son pro-domaine deux DED homologues à FADD [14; 89]. Suite à ce recrutement, le rapprochement des pro-caspases-8 permet leur auto-protéolyse et activation. La caspase-8 active va par la suite aller activer les caspases exécutrices qui iront cliver des substrats essentiels à la survie cellulaire.

1.2.3 Les protéases apoptotiques

Les principaux changements morphologiques observés lors de l'apoptose résultent de l'action de protéases nommées caspases. Les caspases sont des aspartases, c'est à dire qu'elles clivent leurs substrats après un acide aspartique [31]. Elles sont toutes synthétisées sous forme de zymogène inactif composé de trois domaines, soit un pro-domaine N-terminal suivi de la grande et la petite sous-unité catalytique. L'activation des caspases requiert un premier clivage entre la petite et la grande sous-unité, suivi d'un second clivage permettant d'éliminer le pro-domaine pour former l'hétérodimère actif. Les sites de clivage séparant les trois domaines contiennent tous un acide aspartique, donc les caspases peuvent s'activer entre elles ou s'auto-activer. Les caspases apoptotiques peuvent être divisées en deux groupes, les caspases initiatrices et les caspases exécutrices. Les caspases initiatrices possèdent toutes une région située dans leur pro-domaine qui leur permet d'interagir avec des protéines adaptatrices. Le recrutement des caspases initiatrices aux adaptateurs en permet le rapprochement et l'augmentation de leur concentration locale. Puisque les pro-caspases possèdent une faible activité protéolytique intrinsèque, cette agrégation est suffisante pour induire leur auto-activation par protéolyse croisée. Lorsque activées, les caspases initiatrices iront activer les caspases exécutrices, qui iront cliver des protéines cellulaires vitales.

1.2.4 Apoptose et système immunitaire

Le système Fas-FasL est impliqué dans trois fonctions du système immunitaire soit la résolution de la réponse immunitaire, la cytotoxicité et l'immunoprivilège [79; 91; 128]. L'apoptose induite via le récepteur Fas est essentielle à l'homéostasie du système immunitaire [71]. L'importance de l'apoptose médiée par FasL est bien illustrée chez les souris *lpr*, *lpr^{cg}* et *gld* qui présentent des défauts au niveau de Fas ou de son ligand [92]. Chez les souris *lpr*, l'épissage de Fas est altéré ce qui empêche son expression en surface. Les souris *lpr^{cg}* possèdent une mutation ponctuelle dans le domaine de mort de Fas qui empêche le recrutement de l'adaptateur FADD. Les

souris *gld* possèdent une mutation dans la région C-terminale de FasL qui empêche sa liaison à Fas. Ces trois types de souris présentent des désordres immunitaires importants tels une lymphadénopathie et une incidence accrue de maladies auto-immunitaires. Des cas de lymphadénopathie associés à la voie Fas-FasL existent aussi chez l'humain [35; 108]. La stimulation d'une cellule T par un antigène mène à son activation et sa prolifération. FasL n'est pas exprimé de manière constitutive chez celles-ci, mais suite à l'activation il y a une expression rapide de FasL. Bien que les cellules T expriment le récepteur Fas de manière constitutive, celles-ci sont réfractaires à l'apoptose médiée par FasL en présence de facteurs de survie. Lorsque les signaux de survie diminuent en quantité, les cellules activées T deviennent alors sensibles à l'apoptose par le phénomène nommé AICD (Activation-Induced Cell Death) [94]. Étant donné que les souris *lpr* et *gld* présentent une déficience de la voie apoptotique Fas/FasL, les lymphocytes activés ne sont pas éliminés suite à une réponse immunitaire. Cette lymphoprolifération contribue à l'incidence accrue de maladies auto-immunitaires chez ces souris.

1.2.5 Les sites immunoprivilégiés

Outre le système immunitaire, FasL est exprimé de manière constitutive chez certains sites nommés immunoprivilégiés. Les sites immunoprivilégiés ont d'abord été définis comme étant des lieux permissifs aux allogreffes malgré une incompatibilité entre donneur et receveur. Plusieurs organes sont dits immunoprivilégiés: le cerveau, les ovaires, les testicules, le placenta, les yeux. Les facteurs responsables de l'immunoprivilège sont multiples: barrière physique, expression locale de cytokines immunosuppressives comme le TGF- β [131], faible expression de CMH et localisation stratégique des cellules présentatrices d'antigène. L'expression de FasL dans la partie antérieure de l'œil et chez les cellules de Sertoli des testicules, est essentielle pour maintenir l'immunoprivilège de ces tissus car ceci induit l'apoptose des cellules T activées pénétrants ces sites [7; 42].

Le potentiel d'utiliser l'immunoprivilège attribuable à l'expression de FasL pour faciliter la transplantation d'organes a été évalué dans des modèles murins. Ainsi, des cellules de Sertoli allogéniques transplantées sous la capsule rénale survivent indéfiniment, alors que ces mêmes cellules provenant de souris *gld* ne survivent pas [7]. Cette étude initiale a confirmé le rôle protecteur de FasL pour l'acceptation

d'allogreffes. Plusieurs études subseqentes ont confirmé le potentiel thérapeutique de l'immunoprivilège artificiel. Ainsi, la co-transplantation de cellules pancréatiques avec des myoblastes modifiés pour exprimer FasL a permis d'éviter le rejet d'îlots pancréatiques allogéniques [76]. L'expression forcée de FasL dans des organes entiers par transgénése ou infection virale ont aussi permis une survie prolongée d'allogreffes [5; 37; 78; 122]. Il a été démontré que la protection observée était due à l'apoptose spécifique des cellules T réactives envers la greffe [33; 86]. D'autres études ont cependant démontré que l'expression forcée de FasL par des allogreffes n'a pas toujours l'effet protecteur escompté et peut mener à un rejet accéléré. Le rejet aigu des greffes a été corrélé à une infiltration massive de neutrophiles [3; 59; 124] et il a été proposé que FasL aurait un pouvoir chimiotactique direct envers les neutrophiles [98; 117]. Le mécanisme menant au recrutement de neutrophiles demeure à être élucidé et des études suggèrent que des cellules intermédiaires seraient impliquées [45; 87; 101]. Les raisons expliquant les résultats mitigés obtenus avec FasL pour induire l'immunoprivilège artificiel pourraient être liées au site anatomique utilisé, le niveau d'expression de FasL et la production de cytokines immunosuppressives.

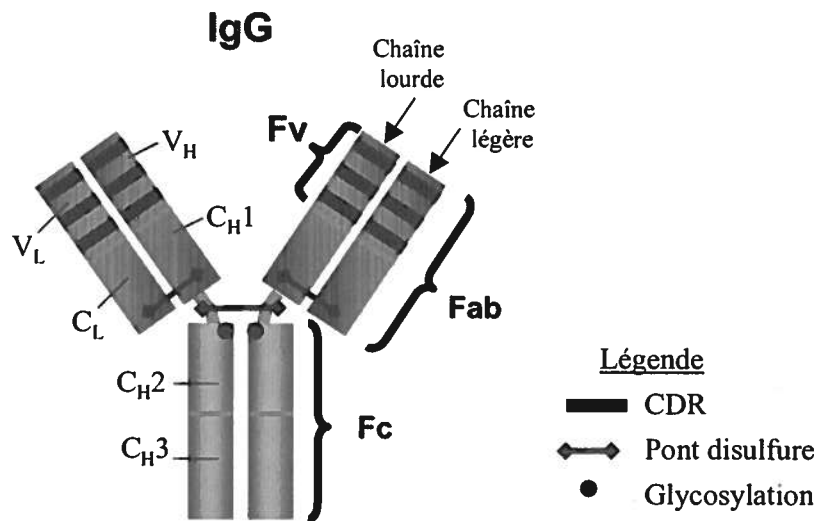


Figure 2. Représentation schématique d'un anticorps IgG

VL : Domaine variable de la chaîne légère
 VH : Domaine variable de la chaîne lourde
 CL : Domaine constant de la chaîne légère
 CH : Domaine constant de la chaîne lourde

Fv : Fragment variable
 Fc : Fragment constant

1.3 Anticorps et molécules dérivées

1.3.1 Description et caractéristiques

Les anticorps sont essentiels à la défense immunitaire et la maturation des lymphocytes B au niveau des organes lymphoïdes permet d'obtenir une grande diversité d'anticorps. Un anticorps est constitué d'une région Fc et de deux bras Fab identiques formés d'une chaîne lourde et légère. Le fragment Fc est reconnu par les récepteurs Fc ce qui permet l'activation de plusieurs fonctions cytotoxiques du système immunitaire. Les chaînes lourdes et légères sont formées d'une région constante et d'une région variable. Chacune des régions variables contient trois régions hypervariables (CDR) impliquées dans la reconnaissance antigénique.

1.3.2 Utilisation des anticorps en immunothérapie

Le développement de la technologie des hybridomes a rendu possible l'utilisation des anticorps à des fins thérapeutiques [69]. Plusieurs études cliniques en cours utilisent les anticorps comme agents thérapeutiques pour les maladies auto-immunitaires, la suppression de rejet de greffe, les maladies inflammatoires comme l'arthrite et le contrôle des allergies [39]. Les anticorps sont principalement utilisés comme agents neutralisants, soit l'inhibition de cytokine, blocage de récepteur ou neutralisation d'agents pathogènes. Le premier anticorps utilisé en immunothérapie est l'Orthoclone-OKT3[®], un IgG murin qui reconnaît le complexe CD3 humain et est utilisé pour contrer le rejet de greffes [25]. Les stratégies d'immunothérapie du cancer sous étude consistent à coupler les anticorps à des agents toxiques tels des drogues, des composés radioactifs, des enzymes ou des toxines [21]. Le Zevalin[®] a été approuvé en 2002 et est un anticorps murin couplé à un agent radioactif pour l'immunothérapie du cancer [22]. L'utilisation thérapeutique d'anticorps murins demeure limitée car une administration répétée peut provoquer une réponse dirigée contre les anticorps de souris [62]. Cette réponse mène à l'élimination rapide des anticorps thérapeutiques, inhibe leur action en les empêchant de se rendre à leurs cibles et peut induire une réponse allergique. Plusieurs stratégies ont été utilisées pour minimiser la réponse immunitaire dirigée contre les anticorps murins. Des anticorps chimériques sont obtenus en fusionnant les régions variables d'un anticorps murin aux domaines constants d'un anticorps humain [16; 88]. Les anticorps humanisés sont obtenus en greffant les régions hypervariables CDR d'un anticorps murin sur un

anticorps humain [55]. Il est maintenant possible de produire des anticorps complètement humains grâce à des souris transgéniques dont le répertoire de gènes d'anticorps ont été remplacés par celui des humains [36; 84].

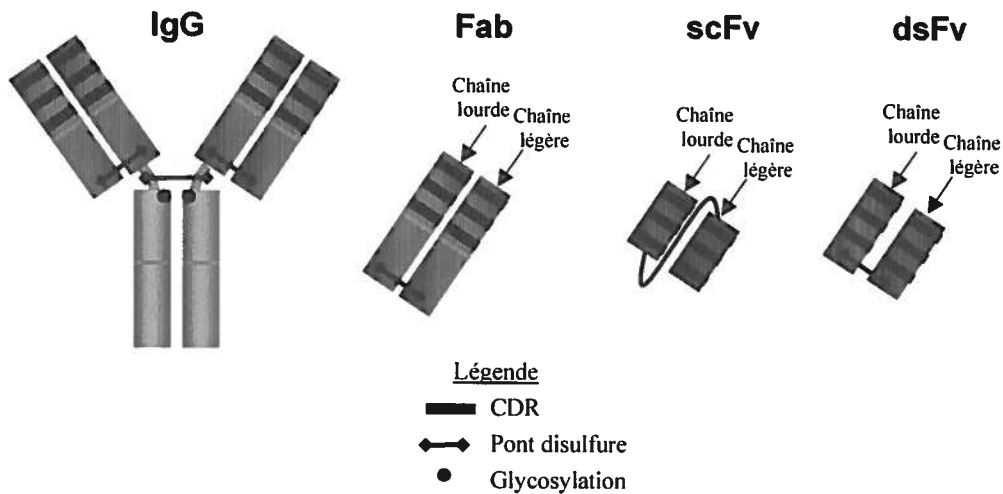


Figure 3. Représentation des fragments d'anticorps

Par rapport aux IgG, les fragments d'anticorps ont une plus faible masse moléculaire donc une meilleure pénétration tissulaire. L'union des chaînes variables lourdes et légères permet d'obtenir le plus petit fragment d'anticorps pouvant lier un antigène.

1.3.3 Fragments d'anticorps et anticorps simple-chaîne

Les premiers fragments d'immunoglobulines ont été produits par protéolyse, ce qui permet d'obtenir le fragment Fab. Les fragments d'anticorps ont l'avantage d'avoir une masse moléculaire plus faible et ne possèdent pas de portion Fc. Plusieurs cellules possèdent un récepteur Fc, ce qui peut mener à la fixation des anticorps sur ces cellules ainsi que l'activation des fonctions cytotoxiques du système immunitaire. La masse moléculaire des Fab (55 kDa) comparativement aux IgG (150 kDa) réduit leur persistance dans la circulation sanguine, ce qui est préférable pour les applications diagnostiques [85]. La faible masse moléculaire des fragments Fab permet aussi une meilleure pénétration tissulaire [19; 85]. Cependant, les Fab ne peuvent être aisément fusionnés de manière génétique à une protéine d'intérêt thérapeutique puisqu'ils sont composés de deux chaînes et leur production nécessite une étape protéolytique. Seules les régions variables des chaînes lourdes et légères déterminent la reconnaissance antigénique. L'introduction d'une charnière peptidique unissant les chaînes lourdes et légères a permis de créer les anticorps simple-chaîne (scFv) [11; 50]. Outre

l'utilisation d'une charnière, l'association de ces deux régions peut être induite par l'ajout de cystéines afin de forcer la formation d'un pont disulfure inter-chaîne (dsFv) [18]. Les scFvs, ayant une masse moléculaire d'environ 30 kDa, constituent le plus petit fragment d'anticorps pouvant lier l'antigène et ont une pénétration tissulaire supérieure aux IgG ou aux Fab [135]. Cependant, la masse moléculaire des scFvs est inférieure à la limite de filtration glomérulaire, ce qui mène à une élimination rénale extrêmement rapide [85]. Cette propriété est désirable pour les applications diagnostiques, mais n'est pas idéale pour les applications thérapeutiques. Pour pallier à ce problème, il est possible de former des scFvs multimériques, ce qui augmente leur masse moléculaire et réduit leur élimination rénale. De plus, l'augmentation de la valence des scFvs permet d'augmenter leur avidité envers l'antigène et peut être avantageuse s'ils sont liés à un partenaire de fusion nécessitant une oligomérisation pour leur activité biologique, comme c'est le cas pour FasL.

1.3.4 Multimérisation d'anticorps simple-chaîne

La charnière la plus utilisée pour former un scFv monovalent est composée de trois répétitions de quatre glycines et d'une sérine (Gly₄Ser)₃ conférant la flexibilité nécessaire pour unir les deux chaînes dans la bonne conformation. Les charnières plus courtes ne donnent pas une flexibilité suffisante, ce qui induit l'oligomérisation des scFvs. L'usage d'une charnière de trois à douze acides aminés force l'association des scFvs en dimères (60 kDa) ayant deux domaines Fv fonctionnels [46]. La réduction de la charnière en deçà de trois résidus favorise la formation de trimères (90 kDa) et de tétramères (120 kDa) [52; 77]. Alternativement, l'ajout de cystéines C-terminales aux scFvs permet leur dimérisation par formation de ponts disulfures ou par conjugaison chimique *in vitro* avec un agent de liaison tel le bis-maléimide [1; 26; 40; 49; 64; 65; 109]. L'introduction d'un domaine de multimérisation permet la dimérisation, trimérisation ou tétramérisation [103]. La formation de dimères peut être obtenue par l'usage d'une hélice amphipathique [100] ou d'un domaine leucine zipper [70], alors que la formation de tétramères est possible grâce au domaine de tétramérisation de p53 [107] ou du pontage avec la streptavidine [29]. Puisque les scFvs sont monovalents alors que les IgG sont divalents, ceci a un impact majeur sur leur avidité. Cependant, un scFv divalent possède une affinité équivalente à l'anticorps parental [9; 65], ce qui permet une meilleure rétention tissulaire [1; 99]. De plus, bien que la masse moléculaire d'un scFv divalent et d'un Fab soit similaire, les scFvs divalents

ont une persistance plus élevée grâce à l'avidité supérieure conférée par la présence de deux sites de liaison à l'antigène [2].

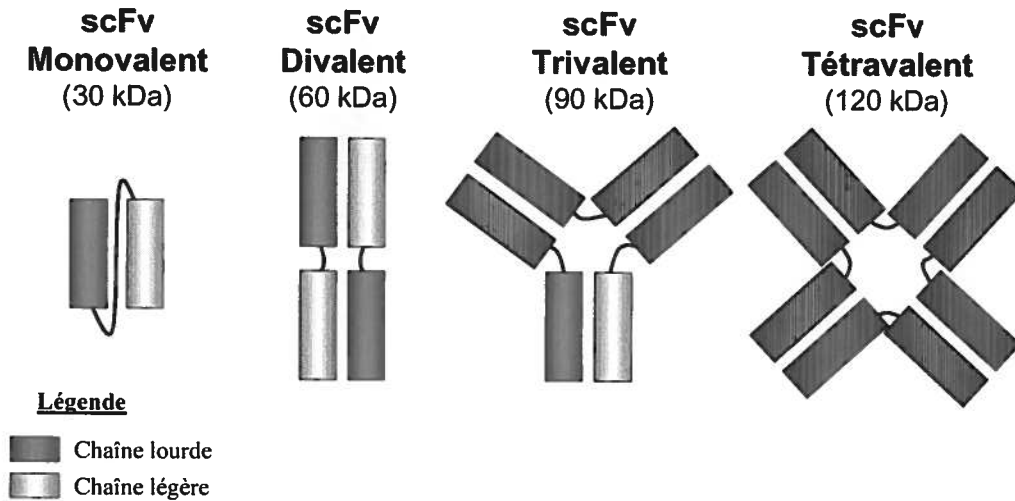


Figure 4. Influence de la charnière sur la valence des scFvs

La taille de la charnière utilisée pour unir les chaînes variables d'un scFv affecte la valence de celui-ci. L'utilisation d'une charnière courte force l'oligomérisation des scFvs afin de former le site de reconnaissance à l'antigène. En variant la taille de la charnière, il est possible de former des scFvs monovalents, divalents, trivalents ou tétravalents.

1.3.5 Production d'anticorps simple-chaîne

La croissance rapide des bactéries en fait des hôtes de choix pour la production de scFvs à coût modeste et l'hôte le plus utilisé est la bactérie *Escherichia coli*. Les scFvs peuvent être exprimés dans le cytosol ou dans l'espace périplasmique. Lors de la production cytoplasmique, les scFvs se retrouvent sous forme de corps d'inclusion car cet environnement réducteur empêche la formation des ponts disulfures requis pour le repliement des deux domaines Ig. Il est donc nécessaire de procéder à une étape de renaturation pour permettre la formation des ponts disulfures et acquérir la bonne conformation [20; 51]. Cette renaturation est d'une efficacité limitée et seulement une fraction des scFvs renaturés conserveront leur activité biologique. L'expression périplasmique permet la formation de ponts disulfures et l'acquisition de la bonne conformation, car cet environnement est oxydatif [10; 119]. Un vecteur possédant un peptide signal est donc requis pour assurer le transport de scFvs vers le périplasme. Les scFvs peuvent ensuite être extraits du périplasme par choc osmotique, ce qui réduit le nombre de contaminants par rapport à l'expression cytoplasmique.

Lorsque la présence de modifications post-traductionnelles est absolument nécessaire, des cellules eucaryotes doivent être utilisées. Les cellules de mammifères assurent l'obtention de modifications post-traductionnelles authentiques [28; 56; 111]. Les cellules d'insecte ont été utilisées avec succès pour produire des anticorps [6; 81]. L'expression en levure représente une alternative économique et *Pichia pastoris* ainsi que *Saccharomyces cerevisiae* sont les hôtes les plus utilisés [32; 34; 48]. Finalement, il est possible de produire des scFvs toxiques pour les cellules par traduction *in vitro* [93].

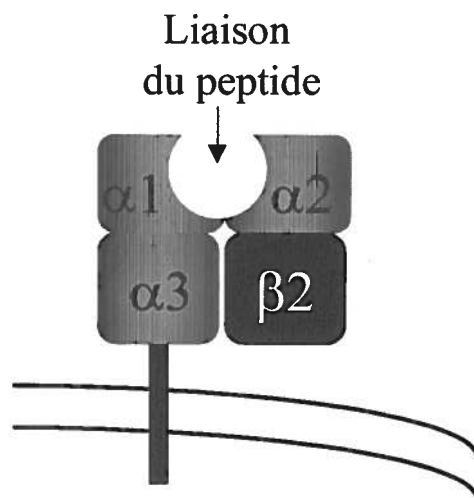


Figure 5. Représentation d'une molécule du CMH I

Les CMH I sont des hétérodimères composés d'une chaîne lourde ayant une région transmembranaire et composés de trois domaines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$). La $\beta 2$ -microglobuline est une protéine soluble qui est associée de manière non covalente à la chaîne lourde.

1.4 Molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (figure 5) sont des glycoprotéines hautement polymorphiques qui sont les cibles majeures reconnues par le système immunitaire lors du rejet de greffe. Étant donné les nombreuses différences au niveau du patron de CMH exprimés entre individus, ceux-ci représentent une signature moléculaire unique pour discriminer donneur et receveur dans un contexte d'allogreffe. Le but de ce projet était de cibler spécifiquement FasL vers des

allogreffes pour induire l'immunoprivilège artificiel. Le CMH de classe I (CMH I) a donc été choisi pour construire des chimères composées de FasL et d'un scFv spécifique aux CMH I des donneurs. Les CMH I sont exprimés à la surface de toutes les cellules nucléées et sont des hétérodimères composés d'une chaîne lourde associée de façon non covalente à une protéine soluble, la β 2-microglobuline. La chaîne lourde est ancrée à la membrane et sa région extracellulaire est composée des trois domaines α 1, α 2 et α 3 [13]. La β 2-microglobuline s'associe à la chaîne lourde et forme le quatrième domaine du complexe. Contrairement aux chaînes lourdes, la β 2-microglobuline est non-polymorphique. Les domaines α 1 et α 2 forment la niche peptidique dans laquelle un peptide de 8 à 10 acides aminés ira s'insérer [12; 13; 80]. Les CMH I murins sont nommés H-2 et contiennent les trois locus H-2K, H-2D et H-2L, tandis que chez l'humain le système CMH est nommé HLA (Human Leukocyte Antigen) et contient trois locus nommés HLA-A, HLA-B et HLA-C.

1.5 Projet de recherche

Le but du projet de recherche était de créer des sites immunoprivilégiés artificiels en forçant l'expression de FasL sur des greffes. Pour ce faire, l'approche préconisée est une nouvelle approche utilisant des protéines de fusions constituées de la portion extracellulaire de FasL et d'un scFv. Les scFvs seront dirigés contre des molécules propres aux donneurs soit les CMH I, permettant ainsi le ciblage précis de FasL uniquement au niveau de la greffe. L'utilisation de scFv comme molécule de ciblage est une nouvelle approche par opposition aux méthodes de transgénèses qui sont non applicables chez l'humain. Le premier objectif du projet de recherche était de générer un scFv spécifique à des CMH I d'un modèle murin d'allogreffe. De plus, FasL doit se trouver sous forme trimérique pour permettre l'induction de l'apoptose. Le deuxième objectif consistait donc en l'élaboration de chimères scFv-FasL qui permettraient la trimérisation de FasL. Pour ce faire, deux méthodes ont été utilisées soit l'augmentation de la valence des scFvs et l'utilisation d'un domaine de trimérisation.

2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

2.1 Souches bactériennes utilisées

Tableau I. Génotype des souches bactériennes utilisées

Souche Bactérienne <i>Escherichia coli</i>	Génotype
Top 10 (InVitrogen)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL(Str^R) endA1 nupG</i>
DH5α (InVitrogen)	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>
XL1-Blue	F ['] : :Tn10 <i>proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ) M15/ recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) glnV44 relA1 lac</i>
GI724 (InVitrogen)	F ⁻ λ ⁻ <i>lacI^q lacPL8 ampC::P_{trp} cI mcrA mcrB INV(rnnD-rnnE)</i>
HB2151 (Amersham Biosciences)	Δ(<i>lac-pro</i>), <i>ara, nal^r, thi/F'</i> [<i>proAB, lacI^q, lacZ</i> Δ M15]

2.2 Tampons et milieux utilisés

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

Nom du tampon	Concentration finale (1X)	Provenance
NEB 1	10 mM Bis Tris Propane-HCl (pH 7.0), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT	NEB
NEB 2	10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 1 mM DTT	NEB
NEB 3	50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 1 mM DTT	NEB
NEB 4	20 mM Tris-acétate (pH 7.9), 10 mM magnésium acétate, 50 mM potassium acétate, 1 mM DTT	NEB
5X First Strand Buffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl ₂	GibcoBRL
Tampon d'ADN polymérase de T4	10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT	NEB
Tampon d'ADN ligase de T4	50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 1 mM ATP 25 μg/ml BSA	NEB
Tampon de polynucléotide kinase de T4	70 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT	NEB
Solution saline	1.2 M NaCl, 60 mM MgCl ₂	InVitrogen
Tampon de PCR DeepVent	20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2 mM Mg SO ₄ , 0.1 % Triton X-100	NEB

Tableau III. Composition des milieux et tampons utilisés

2X YT	1.7 % Bacto-Tryptone, 1 % Extrait de levure, 85 mM NaCl
LB	1% Bacto-Tryptone, 0,5% Extrait de levure, 170 mM NaCl
Tampon de liaison IMAC	50 mM NaPO ₄ , 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole, 5% glycérol, (pH 8.0)
Tampon de lavage IMAC	50 mM NaPO ₄ , 500 mM NaCl, 40 mM Imidazole, 5% glycérol, (pH 8.0)
PBS	150 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , (pH 7.4)
PBST	150 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 0.2% Tween-20, (pH 7.4)
RM	42 mM Na ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , 9 mM NaCl, 19 mM NH ₄ Cl, 2% casamino acids, 1% glycérol, 1 mM MgCl ₂
RM d'induction	42 mM Na ₂ HPO ₄ , 22 mM KH ₂ PO ₄ , 9 mM NaCl, 19 mM NH ₄ Cl, 0.2% casamino acids, 0.5% glucose, 1 mM MgCl ₂
Solution I	50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, (pH 8.0)
Solution II	0.2 N NaOH, 1% SDS
Solution III	150 mM Acétate de Potassium, 1% Acide Formique
Solution de blocage	PBS supplémenté de 3% BSA, 0.2% Tween 20, 0.2 % gélatine, 0.1% NaN ₃
Tampon de transfert	25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine
Tampon de migration	25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine, 0.5% SDS
Gel d'entassement	0.125 M Tris (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.1% TEMED, 4% Acrylamide/Bis-acrylamide
Gel de séparation	0.375 M Tris (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.05% APS, 0.05% TEMED, Concentration variable d'Acrylamide/Bis-acrylamide
Tampon électroporation	120 mM KCl, 10 mM K ₂ HPO ₄ , 25 mM HEPES, 2 mM MgCl ₂ , 5 mM N-acétylcystéine
Tampon de dépôt d'ADN	0.25% bleu de bromophénol, 40% glycérol
Tampon de dépôt protéique	62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycérol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoéthanol, 0.05 % bleu de bromophénol
Tampon de sphéroplaste	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20% sucrose
TAE 1X	40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA, (pH 8.3)
TBE 1X	89 mM Tris Base, 89 mM Acide Borique, 2 mM EDTA, (pH 7.4)
TBS	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl
TBST	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.01% Tween 20
TES 5X	200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mM EDTA, 0.5 M sucrose

Tableau IV. Liste des oligonucléotides utilisés

#	Nom	Séquence 5' → 3'
1	5' H ₂ D	GGGAATTCATGGGGCGATGGCTCCGCGCACGCTGCTCCTG
2	3' H ₂ D	TTGGATCCAGGCAGCTGTCTTCACGCTTTACAATCT
3	5' H ₂ K ^b	GGGAATTCATGGTACCGTGCACGCTGCTC
4	3' H ₂ K ^b	TTGGATCCAGGCAGCTGTCTTCACGCTAGAGA
5	5' Chaîne lourde	TATGCGGCCAGCCGGCCAGGTSMAACTGCAGSAGTCWGG
6	3' Chaîne légère	TTTTGCGGCCGNCGTTTTSAKYTCCAGCTTNGTNCC
7	5' Kappa2 monovalent	GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGAYATYKTGMTG ACNCARWCTCCA
8	3' lourde monovalent	AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCTCCACCTGAGGAGACGGT GACCGTGGTCCC
9	5' scFv divalent	GGAGGTGGCTCTGAYATYKTGMTGACNCARTCTCCA
10	3' scFv divalent	AGAGCCACCTCCGCCTCCTCCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT
11	5' scFv trivalent	CACCGTCTCCTCAGGTGACATCCAGATGACTC
12	3' scFv trivalent	GAGTCATCTGGATGTCACCTGAGGAGACGGTG
13	Histidine pCANTAB	CCCATATGGCGGCCGAGGTTCCCACCATCACCATCACCATG CCGCATAGACTGTTGAAAGTTG
14	5' Charnière scFv-FasL	GGCCGCAGGCGGGGGAGGTTCCGGAATTCTGGATCCTTAAGG
15	3' Charnière scFv-FasL	GGCCCCCTTAAGGATCCAGAATTCCGGAACCTCCCCGCCTGC
16	5' PCR-CMV	ATGCCAAGTACGCCCCC
17	3' delHA FseI	AAAAGATCTGGCCGGCCCGTACCAGTGGAACCTGGAA
18	M13 Reverse	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
19	3' scFv FseI	CCAGACTCCTGCAGCTTACCTGGGCCGGCCCATAGAAAGGA AC
20	5' Zipper 1	CCGGTCAACACCACCAACACCAACGGATGAAGCAGATCGAGG ACAAGATCGAGGAGATCTTGTCGAAG
21	3' Zipper 1	GATGTGGTAAATCTTGACAAGATCTCCTCGATCTTGTCCTC GATCTGCTTCATCCGTTGGTGTGGTGGTGGTGA
22	5' Zipper 2	ATTTACCACATCGAGAACGAGATCGCCCGGATCAAGAAGCTG ATCGGCGAGCGGCTGCTCA
23	3' Zipper 2	CCGGTGAGCAGCCGCTCGCCGATCAGCTTCTTGATCCGGGCG ATCTCGTTCTC
24	5' PciI	GGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCG
25	3' correct B8 VL	GCTCGACATGTGATGGTGACAGTTTCTCCCACAGATGCAGAT AGGGAGGCTGGAGATTGAGTCATCTGGATGTC
26	5' correct B8 VH	TTCTATGGGCCGGCCGAGGTTACAGCTGCAGCAGTCAGGG
27	S6	GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG
28	5' FADD dn	AAAAGTAGTCCCCGCCATGTTTCGAGGCGGGGGCGGCGGCCG GGCC
29	3' FADD dn	GCAAAAAGGATCCGCCCATCAGGACGCTTCGGAGGTAGATG
30	3' CMH I interne	CAGCTCCTCCCCATTCAACTGCC
31	5' Lac pCANTAB	GTGAGTTAGCTCACTCATTAG
32	M13 Universel	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
33	B1	CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC

34	R2	CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC
35	S1	CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC
36	BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
37	T7	TAATACGACTCACTATAGGGAGA
38	5' SR α	TGCTTGCTCAACTCTACGTC
39	3' SR α	ACTGCATTCTAGTTGTGGTT
40	pLEX	GGTGACGCTCTTAAAAATTAAGCC
41	B8 dia correction VL	GCTCGACATGTGATGGTGACAGTTTCTCCCACAGATGCAGAT AGGGAGGCTGGAGACTGTGTCATCTGAATATC
42	B8seqzipper	CAACAGCCTACAACCTGAAG
43	5' Actine	GAGGGAAATCGTGCGTGACATCAA
44	3' Actine	GGAACCGCTCGTTGCCAATAGTGA

K=G/T, M=A/C, N=A/C/G/T, R=A/G, S=C/G, W=A/T, Y=C/T

2.3 Vecteurs utilisés

2.3.1 Vecteurs SR α puroMCS1 et SR α hygroMCS1

Le vecteur SR α puroMCS1 (Figure 6) permet l'expression de protéines en cellules eucaryotes. Ce vecteur possède le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection en bactéries ainsi que le gène conférant la résistance à la puromycine pour la sélection en cellules eucaryotes. Le vecteur SR α hygroMCS1 est identique au vecteur SR α puroMCS1 sauf que le gène de résistance à l'hygromycine remplace celui de la puromycine.

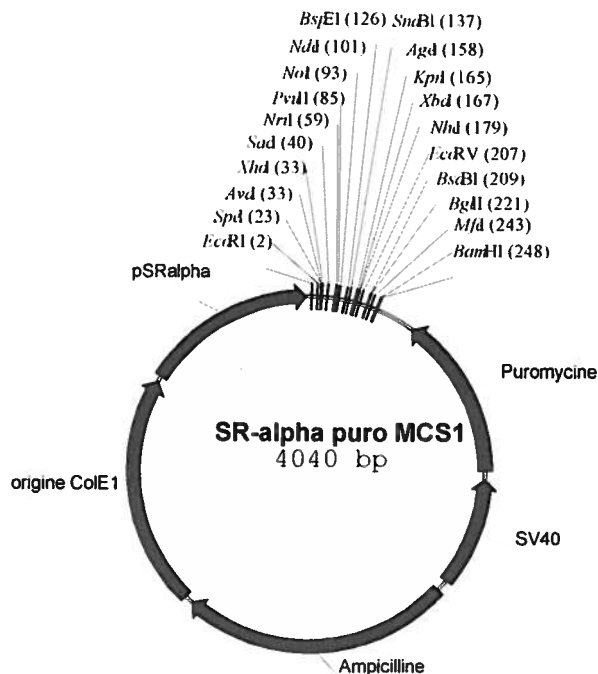


Figure 6. Représentation du vecteur SR α puroMCS1

2.3.2 Vecteur pCR4Blunt-TOPO

Le vecteur pCR4Blunt-TOPO (InVitrogen, Figure 7) permet le clonage direct de fragments de PCR ayant des extrémités franches. Ce vecteur est fourni linéarisé avec une topoisomérase I liée de manière covalente aux extrémités 3' du vecteur. La topoisomérase catalyse l'intégration du produit de PCR au vecteur [118].

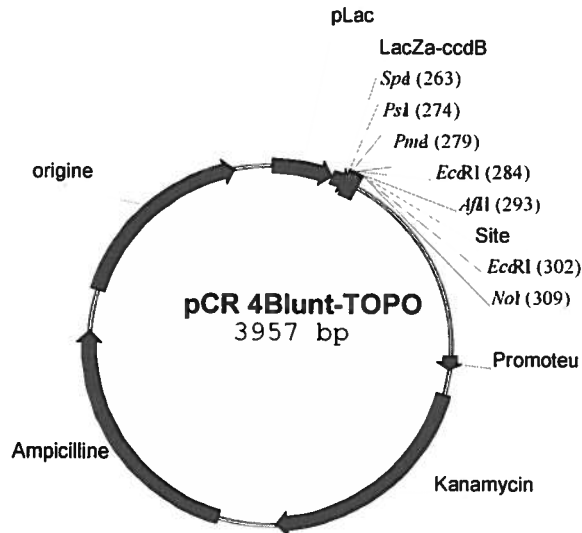


Figure 7. Représentation du vecteur pCR4Blunt-TOPO

2.3.3 Vecteur pDisplay

Le vecteur pDisplay (InVitrogen, Figure 8) permet d'exprimer des protéines à la surface de cellules eucaryotes grâce au domaine transmembranaire présent dans ce vecteur. Il possède les gènes conférant la résistance à l'ampicilline pour la sélection en bactéries et au G-418 pour la sélection en cellules eucaryotes.

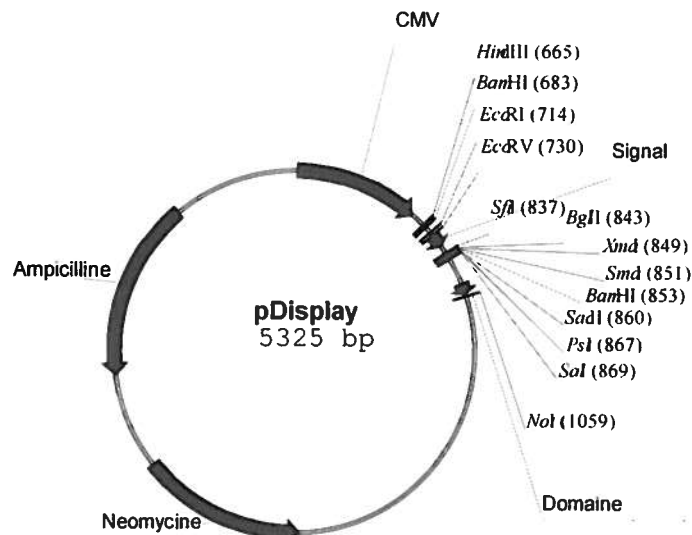


Figure 8. Représentation du vecteur pDisplay

2.3.4 Vecteur pCANTAB 5E

Le vecteur pCANTAB 5E (Amersham Biosciences) (Figure 9) est conçu pour produire des scFvs possédant une étiquette E. Il contient la séquence du gène III du phage M13 ainsi que son origine de réplcation, ce qui permet de produire des phages exprimant des scFvs fusionnés avec la protéine III. Un codon de terminaison étant présent entre le scFv et le gène III, il est nécessaire d'utiliser une souche bactérienne suppressive pour produire des chimères scFv-gène III. L'utilisation d'une souche bactérienne non-suppressive permet la sécrétion des scFvs dans le périplasma. La production de scFv est sous le contrôle du promoteur *lac*. Le vecteur possède le gène conférant la résistance à l'ampicilline.

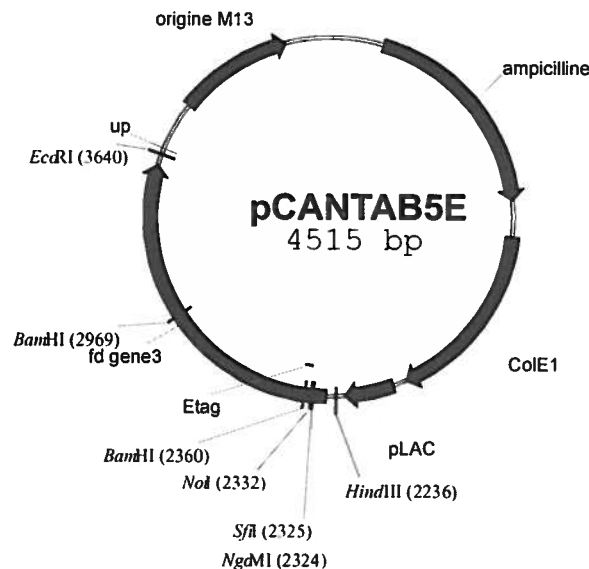


Figure 9. Représentation du vecteur pCANTAB 5E

2.3.5 Vecteur pLEX

Le vecteur pLEX (InVitrogen, Figure 10) est conçu pour l'expression en bactéries de protéines toxiques. La transcription du gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur *cro* du bactériophage λ qui est inactif en présence du répresseur *cI*. Les bactéries GI724 possèdent une copie génomique du répresseur *cI* qui est sous le contrôle du promoteur du tryptophane. En absence de tryptophane, le répresseur *cI* est produit et l'expression du gène d'intérêt est bloquée. L'ajout de tryptophane au milieu de culture inhibe l'expression du répresseur et la transcription du gène d'intérêt est alors activée.

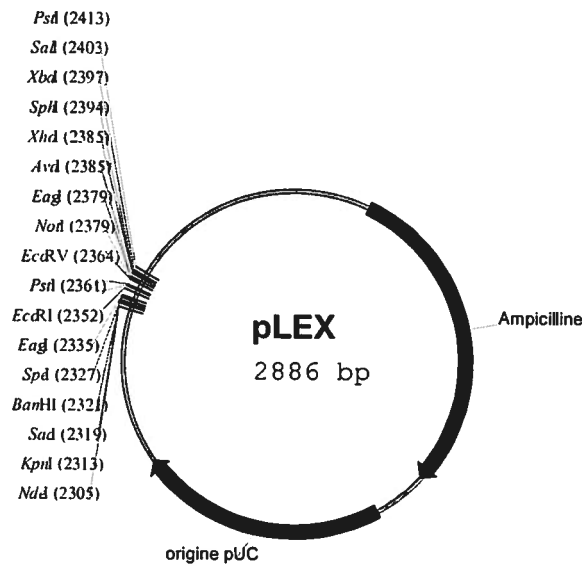


Figure 10. Représentation du vecteur pLEX

2.4 Clonage d'ADN

2.4.1 Extraction d'ARN et synthèse d'ADNc

Les extractions d'ARN ont été effectuées à partir de cellules en culture ou de rates de souris. Lorsque l'extraction a été effectuée à partir de rate de souris, les rates ont été broyées entre deux lames givrées, les cellules lavées avec du PBS puis resuspendues dans du TRIZOL (GibcoBRL). Les cellules en culture ont été lavées avec du PBS, centrifugées 5 min à 1,500 x g puis resuspendues dans du TRIZOL. La quantité de TRIZOL était 1 ml pour 4 millions de cellules. Suite à une incubation de 5 min sur la glace, 100 µl de chloroforme ont été ajoutés par ml de TRIZOL. Après une centrifugation de 5 min à 21,000 x g, la phase aqueuse contenant l'ARN a été conservée puis a été précipité par ajout d'un volume d'isopropanol froid suivit d'une incubation de 15 min à -20°C. Après une centrifugation de 15 min à 21,000 x g, l'ARN a été resuspendu dans de l'eau stérile et dosé avec un spectrophotomètre GeneQuant II (Pharmacia). Cinq µg d'ARN ont été combinés à 0.5 µg d'oligo dT et 0.8 mM de dNTPs (InVitrogen) dans un volume total de 12 µl. Le mélange a été incubé 5 min à 65°C suivit d'un refroidissement sur glace. Quatre µl du tampon 5X First-Strand Buffer ont été ajoutés ainsi que 2 µl de DTT 0.1 M (GibcoBRL) et 1 µl d'inhibiteur de ribonucléase (GibcoBRL). Le mélange a été incubé 2 min à 42°C et la réaction a été amorcée par l'ajout de 1 µl de Superscript II (GibcoBRL). Les réactions ont été incubées 50 min à 42°C, puis l'enzyme a été inactivée par une incubation de 15 min à 70°C.

2.4.2 Réaction de polymérase en chaîne

La liste des amorces utilisées est présentée dans le Tableau IV. Elles ont été synthétisées par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS Institut Armand-Frappier. Chacune des réactions de PCR a été effectuée dans un volume final de 50 µl. Le milieu réactionnel était constitué du tampon à PCR, de 0.2 mM de dNTP, de 10 pmol de chaque amorce, de 1 U d'ADN polymérase Taq, de 0.04 U d'ADN polymérase DeepVent (NEB) et de 50 ng d'ADN. Lorsque le PCR était effectué à partir d'ADNc, 2 µl d'ADN étaient utilisés par réaction de PCR. Les réactions d'amplifications par PCR ont été effectuées sur un thermocycleur PTC-200 (MJ Research). Une première étape de dénaturation a été effectuée à 94°C pendant 6 min puis 25 ou 30 cycles ont été effectués selon les conditions suivantes: dénaturation d'une min à 94°C, hybridation de 1.5 min à 55°C et élongation de 2 min à 72°C. La réaction a été terminée par une élongation finale de 6 min.

2.4.3 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 et le mélange a été agité sur vortex suivi d'une centrifugation de 5 min à 21,000 x g. La phase aqueuse a été conservée et l'ADN a été précipité par ajout de 0.1 volume de NaOAc 3 M (pH 5.2), de 10 µl d'ARNt (10 mg/ml) et de 2.5 volume d'éthanol froid. Les échantillons ont été incubés un minimum de 15 min à -20°C avant d'être centrifugés 10 min à 21,000 x g. Le culot d'ADN a été séché 2 min dans un bloc chauffant à 55°C, resuspendu dans un volume d'eau approprié et incubé 5 min à 55°C pour faciliter la dissolution.

2.4.4 Manipulations d'extrémités d'ADN

Les polissages d'extrémités d'ADN 3' saillantes ont été effectués avec l'ADN polymérase du phage T4. (NEB). Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 100 µl avec 10 µl du tampon 10X de la T4 ADN polymérase, 0.1 mM de dNTPs et 1 U d'enzyme par µg d'ADN. Les réactions ont été incubées 20 min à la température ambiante puis l'enzyme a été inactivée à 70°C pendant 20 min. Les polissages d'extrémités d'ADN 5' saillantes ont été effectués avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I (NEB). Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 100 µl contenant 2 mM de dNTP, 10 µl du tampon NEB 2 et 1 U d'enzyme par µg d'ADN. Les réactions ont été incubées 1 h à 37°C.

Lorsqu'approprié, le vecteur a été déphosphorylé avec la CIP (NEB) afin de réduire leur recircularisation. Immédiatement après digestion de l'ADN, les enzymes de restrictions ont été inactivées à la chaleur et la CIP ajoutée. Le milieu réactionnel était constitué de 5 µg de vecteur, 5 µl de tampon NEB 3 et de 20 U de CIP dans un volume final de 50 µl. La réaction a été incubée 30 min à 37°C.

2.4.5 Clonage de fragments d'ADN

Lors de clonage, 5 µg d'ADN ont été digérés avec 15 U d'enzyme (NEB) dans un volume final de 50 µl contenant 5 µl du tampon de digestion NEB approprié. Les digestions ont été incubées à la température recommandée pendant trois heures. Suite à la digestion, si nécessaire, les enzymes ont été inactivées à la chaleur et les fragments d'ADN purifiés. La ligation d'un fragment d'ADN à un vecteur s'effectuait toujours selon un rapport molaire 3:1 (insert:vecteur). La concentration totale d'ADN lors de la ligation était d'environ 10 ng/µl. Les ligations ont été effectuées dans un volume final de 10 µl contenant 1 µl du tampon de T4 ADN ligase et 0.5 µl de T4 ADN ligase (NEB). Les réactions ont été incubées 30 min à 37°C. Lorsqu'il était possible de le faire, une digestion post-ligation a été effectuée afin de linéariser le vecteur parental et réduire le nombre de colonies non-recombinantes. Pour ce faire, la ligase a été inactivée à la chaleur et le volume de l'échantillon augmenté à 25 µl par ajout de 10 µl d'eau, de 2.5 µl du tampon de digestion approprié et de 2.5 µl de l'enzyme de restriction. Les digestions ont été incubées 30 min à la température recommandée. Pour les clonages dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO, les réactions se sont effectuées selon les directives du fabricant avec 1 µl de vecteur pCR4Blunt-TOPO (10 ng), 1 µl de solution saline et une concentration équimolaire du produit de PCR.

2.4.6 Clonage d'oligonucléotides

Une quantité équimolaire d'oligonucléotides complémentaires ont été combinés et dénaturés à 95°C pendant 10 min. Les oligonucléotides ont ensuite été hybridés par incubation à 42°C pendant 20 min. Une fois hybridés, les oligonucléotides ont été phosphorylés avec la polynucléotide kinase de T4 (NEB) afin de permettre leur ligation. La réaction de phosphorylation a été effectuée dans un volume de 50 µl contenant 300 pmol d'ADN hybridé, 5 µl du tampon de polynucléotide kinase de T4,

1 mM d'ATP et 1 U de polynucléotide kinase. La réaction a été incubée 30 min à 37°C et l'enzyme a été inactivée par incubation à 70°C pendant 20 min. La ligation des oligonucléotides au vecteur a été effectuée selon un ratio insert:vecteur de 10:1, ce ratio étant calculé en molarité. La ligation a été effectuée dans un volume final de 10 µl contenant 1 µl du tampon d'ADN ligase de T4 et 0.5 µl d'ADN ligase de T4 (NEB). La réaction a été incubée à 37°C pendant 30 min avant de procéder à la transformation bactérienne.

2.4.7 Gels d'agarose analytiques

Les gels d'agarose analytiques se sont effectués dans du tampon TBE contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium. Quatre µl de tampon de dépôt à ADN ont été ajoutés par 10 µl d'échantillon. L'échelle de masse moléculaire utilisée était 2 µg d'ADN du bactériophage Lambda digéré par *Pst*I. L'électrophorèse a été effectuée à 10 V/cm jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel. Les bandes d'ADN ont été révélées sur un transilluminateur UV et saisies avec un appareil AlphaImager 3400 (AlphaInnotech). La quantification d'ADN a été effectuée par comparaison des inconnus à l'échelle λ /*Pst*I par intégration des volumes avec le logiciel AlphaEase.

2.4.8 Purification d'ADN sur gel

Les échantillons à purifier ont été précipités à l'éthanol, resuspendus dans 50 µl d'eau, puis 10 µl de tampon de dépôt d'ADN ont été ajoutés. Les gels préparatifs ont été effectués dans du tampon TAE et la migration a eu lieu à 7 V/cm. Suite à la visualisation aux UV, les ADNs ont été purifiés par extraction au phénol chaud ou par purification sur colonne à filtre. Pour l'extraction au phénol chaud, de l'agarose à basse température de fusion a été utilisée. Les bandes excisées ont été pesées et 1 µl d'eau/mg d'agarose a été ajouté ainsi que 0.1 volume d'acétate de Sodium 3M (pH 5.2). L'agarose a été fondue par incubation de 5 min à 70°C puis un volume égal de phénol a été ajouté, mélangé au vortex et incubé à 70°C pendant 15 min. L'agarose a été éliminée par centrifugation à 21,000 x g pendant 5 min et la phase aqueuse supérieure a été conservée. Une nouvelle extraction au phénol a été effectuée en conservant toujours la phase aqueuse. Dix µl d'ARNt (10 mg/ml) ont été ajoutés et deux extractions phénol/chloroforme ont été effectuées suivies d'une précipitation à l'éthanol. Les échantillons ont été resuspendus dans un volume approprié d'eau. Pour la purification sur colonne à filtre, les bandes d'ADN excisées ont été transférées dans

une colonne de centrifugation avec filtre de type Spin-X[®] (Corning-Costar). Les échantillons ont été placés à -80°C pendant 15 min puis décongelés à la température ambiante. L'ADN a été extrait de l'agarose par centrifugation à 13,000 x g pendant 10 min. Cent µl d'eau ont été ajoutés et les échantillons ont été centrifugés 5 min à 13,000 x g. L'ADN a ensuite été précipité à l'éthanol et resuspendu dans un volume approprié d'eau.

2.4.9 Transformation bactérienne

Préparation de bactéries électrocompétentes

Une préculture de 100 ml dans du milieu LB a été incubée à 37°C avec agitation pendant 16 à 18 h afin de produire des bactéries électrocompétentes. Cinq ml de préculture ont été utilisés pour ensemercer 100 ml de milieu LB. La culture a été incubée à 37°C avec agitation jusqu'à ce que la DO⁵⁵⁰ soit située entre 0.46 et 0.62. À ce moment, la culture a été incubée sur glace 20 min puis centrifugée 20 min à 3,300 x g et à 4°C. Le surnageant a été éliminé, les bactéries lavées avec 100 ml d'eau froide, puis centrifugées de nouveau. Quatre lavages avec 100 ml d'eau froide ont été effectués suivis d'un lavage avec 10 ml d'une solution aqueuse froide contenant 10% de glycérol. Les bactéries ont été resuspendues dans 1 ml d'eau froide contenant 10% de glycérol et aliquotées en 50 µl.

Transformation par choc thermique

L'ADN refroidi a été ajouté à 50 µl de bactéries compétentes froides et incubé sur glace pour une période de 20 min. Le choc thermique a été effectué en incubant les bactéries 1.5 min à 42°C suivi d'un refroidissement immédiat sur glace. Les bactéries ont ensuite été resuspendues dans 1 ml de milieu de culture LB stérile et incubées pendant une heure à 37°C afin de permettre l'expression du gène de résistance. Par la suite, différentes dilutions de bactéries transformées, soit 10 µl et 100 µl ont été étalées sur gélose LB-agar (1.5% p/v) contenant l'antibiotique approprié (100 µg/ml d'ampicilline ou 50 µg/ml de kanamycine). Les bactéries transformées restantes ont été centrifugées une min à 9,000 x g et resuspendues dans 100 µl de milieu de culture LB et étalées sur gélose LB-agar contenant l'antibiotique approprié. Les géloses ont été incubées à 37°C de 16 à 18 heures.

Transformation par électroporation

L'ADN à transformer a été purifié par phénol/chloroforme puis mélangé à 50 µl de bactéries électrocompétentes froides et déposé sur glace dans une cuvette d'électroporation Gene Pulser® (Bio-Rad) de 0.1 cm. Les bactéries ont été électroporées à 25 µF, 1.6 kV avec un électroporateur Gene Pulser® (Bio-Rad). L'adaptation des bactéries ainsi que l'étalement sur gélose est identique à la méthode utilisée lors de la transformation par choc thermique.

2.4.10 Criblage de clones recombinants

L'analyse des clones obtenus lors de transformation a été effectuée par digestions enzymatiques à partir de l'ADN plasmidique obtenu par lyse alcaline. Pour ce faire, 15 à 60 colonies isolées ont été inoculées dans 1 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié (100 µg/ml d'ampicilline ou 50 µg/ml de kanamycine). Les cultures ont été incubées de 16 à 18 h à 37°C sous agitation, centrifugées 1 min à 21,000 x g et le culot bactérien resuspendu dans 100 µl de solution I. Suite à l'ajout de 200 µl de solution II, l'échantillon a été mélangé par inversion avant d'ajouter 150 µl de solution III. Après une centrifugation de 5 min à 21,000 x g, le surnageant a été transféré dans un microtube contenant 1 ml d'éthanol. Les échantillons ont été incubés 20 min à -20°C, puis centrifugés 10 min à 21,000 x g. Le culot d'ADN a été séché 2 min à 55°C et resuspendu dans 30 µl d'eau. Les digestions enzymatiques ont été effectuées selon les conditions suivantes: à 8 µl d'ADN, 1 µl du tampon de digestion approprié, 0.1 µl de Ribonucléase A (10 mg/ml) et 1 µl d'enzyme de restriction ont été ajoutés. Les digestions ont été incubées 1 h à la température recommandée et déposées sur un gel d'agarose pour être analysées.

2.4.11 Préparation d'ADN à grande échelle et séquençage

La purification à grande échelle d'ADN a aussi été effectuée par lyse alcaline. Les clones positifs identifiés ont étéensemencés dans 100 ml de LB contenant l'antibiotique approprié et incubés à 37°C pour 16 à 18 h. La culture a ensuite été répartie dans deux tubes de 50 ml et centrifugée à 3,300 x g pendant 15 min. Le surnageant a été décanté et chacun des culots bactériens a été resuspendu dans 16 ml de solution I. Les échantillons ont ensuite été incubés 10 min avec 250 µl de lysozyme avant de rajouter 16 ml de solution II et d'être mélangé par inversion. Les échantillons

ont été centrifugés à 3,300 x g pendant 15 min et le surnageant a été filtré sur une membrane Miracloth (Calbiochem). Un volume égal d'isopropanol a été ajouté au filtrat et l'ADN a été récupéré par une centrifugation de 20 min à 3,300 x g. Le culot d'ADN a été séché 10 min à 55°C avant d'être resuspendu dans 450 µl d'eau et transféré dans un microtube de 1.5 ml contenant 50 µl d'Acétate de Sodium 3 M (pH 5.2). Les échantillons ont été incubés à 55°C pour 20 min avec 10 µl de Ribonucléase A (10 mg/ml). Les protéines ont été éliminées par plusieurs extractions avec 500 µl de phénol/chloroforme. Les extractions ont été effectuées jusqu'à ce qu'il n'y est plus de dépôt à l'interface de la phase aqueuse et organique. L'ADN plasmidique a ensuite été précipité à l'éthanol et resuspendu dans 100 µl d'eau.

La méthode de séquençage utilisée est basée sur la méthode de terminaison de chaîne de Sanger [112]. L'ADN à séquencer a été obtenu par maxi-préparation et dosé sur gel d'agarose. Le milieu réactionnel du PCR était constitué de 50 fmol d'ADN, 3.2 pmol d'amorce et des réactifs CEQ™ DTCS Kit (Beckman-Coulter), comprenant l'ADN polymérase (0.25 µl), les dNTP (0.25 µl), le tampon de séquençage (2 µl) et les ddNTP (0.5 µl chacun) pour un volume final de 20 µl. Le PCR de séquençage a été effectué selon les conditions suivantes: dénaturation de 20 sec à 96°C, hybridation de 20 sec à 50°C et élongation de 4 min à 60°C pendant 40 cycles. Suite au PCR, l'ADN a été purifié selon le protocole proposé par le fabricant, sauf que le culot d'ADN a été lavé qu'une fois à l'éthanol. Les réactions de séquençage ont été analysées sur un séquenceur automatique CEQ™ 2000XL (Beckman-Coulter) avec les conditions de migration LFR-1. Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel Chromas (Technelysium).

2.5 Production d'anticorps et de scFvs

2.5.1 Production d'anticorps

L'hybridome B8-24-3 (#ATCC:TIB-139) sécrète un anticorps monoclonal reconnaissant les CMH I murins d'haplotype H-2^b et H-2^p. Pour la production d'anticorps, les cellules ont été cultivées dans 1 litre de milieu Hybridoma-SFM (GibcoBRL) à 37°C, 5% CO₂ et agitées sur agitateur magnétique jusqu'à ce qu'un taux de mortalité d'environ 50% soit atteint. Les cellules ont alors été centrifugées 15 min à 500 x g et le surnageant a été filtré sur un filtre Stéricup de 0,22 µm (Millipore).

2.5.2 Production de scFvs avec pCANTAB

Une pré-culture de bactéries HB2151 transformées avec le vecteur pCANTAB contenant les scFvs a été effectuée dans un volume de milieu de culture 2X YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 100 mM de glucose. La pré-culture a été incubée à 30°C, sous agitation continue pendant 16 à 18 h avant d'être diluée dans 20 volumes de 2X YT contenant une concentration identique de glucose et d'ampicilline. La culture a été incubée à 30°C, sous agitation continue jusqu'à l'obtention d'une DO⁵⁵⁰ d'environ 0.6. Les bactéries ont été sedimentées par centrifugation à 1,500 x g pendant 20 min et resuspendues dans le même volume de milieu 2X YT contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 1 mM d'IPTG (Roche). Les cultures ont été incubées à 30°C sous agitation continue. Une cinétique a été effectuée afin de déterminer le temps permettant une production optimale de scFv. Pour ce faire, des aliquots ont été prélevés à différents temps soit: 2, 3, 4 et 18 h. Lors de production à grande échelle, l'induction des bactéries s'est déroulée pour une période de 3 h puis les bactéries ont été centrifugées à 3,300 x g pendant 20 min. Le surnageant a été conservé et filtré sur filtre de 0.22 µm. Les extractions péripasmiques ont été effectuées comme suit: le culot bactérien a été resuspendu dans du TES 5X à raison de 2% du volume de culture. Afin d'induire un choc osmotique, du TES 1X a été ajouté (3% du volume initial) et mélangé par vortex. Les échantillons ont été incubés 30 min sur glace puis centrifugés 10 min à 21,000 x g et le surnageant a été conservé.

Le culot bactérien a été resuspendu dans du PBS à raison de 1/5 du volume initial afin de permettre la purification des corps d'inclusions. Les bactéries ont été soniquées avec un appareil XL-Sonicator® (Heat Systems Inc.) puis centrifugées à 20,000 x g pendant 15 min. Le surnageant a été éliminé et les échantillons lavés avec un volume identique de PBS afin d'éliminer toutes les protéines solubles. Les corps d'inclusions ont été solubilisés par ajout de guanidine.HCl 4 M (1/50 du volume initial) suivit d'une incubation sur glace pendant une heure. Les protéines insolubles ont été éliminées par centrifugation de 15 min à 21,000 x g et le surnageant conservé.

2.5.3 Production de scFvs avec pLEX

Les bactéries GI724 transformées avec le vecteur pLEX contenant les scFvs ont été inoculées dans du milieu RM contenant 100 µg/ml d'ampicilline. La culture a été incubée pendant 16 à 18 h à 30°C avant d'être utilisée pour ensemercer (DO₅₅₀ = 0.1)

du milieu RM d'induction contenant 100 µg/ml d'ampicilline. La culture a été incubée à 30°C afin d'atteindre une DO₅₅₀ de 0.5 et à ce moment la production de scFv a été induite par ajout de 100 µg/ml de tryptophane. Suivant une incubation de 4 h à 37°C, le surnageant a été éliminé par centrifugation à 3,300 x g pendant 20 min et deux lavages au PBS ont été effectués sur le culot bactérien. Les échantillons ont été traités comme suit pour extraire les protéines périplasmiques: le culot bactérien a été resuspendu dans 2 ml de tampon de sphéroplaste par gramme de bactéries et les échantillons ont été incubés 20 min sur glace avec 0.2 mg/ml de lysozyme en les agitant doucement toutes les 5 min. Suivant l'incubation, un volume d'eau froide a été ajoutée et les échantillons ont été incubés 10 min sur glace avant d'ajouter 20 mM de MgSO₄. Le surnageant a ensuite été récolté par centrifugation de 20 min à 3,300 x g.

2.5.4 Purification de scFvs

Les extractions périplasmiques ont été concentrées avec un appareil d'ultrafiltration 8200 (Millipore) ayant une membrane de 10 kDa et une pression d'azote de 50 psi. Les scFvs ont été purifiés par affinité grâce à l'étiquette de polyhistidine présent en 3'. Une colonne de résine de nickel ProBond (InVitrogen) de 3 ml a été préparée selon les directives du manufacturier avant d'être équilibrée avec 30 ml de tampon de liaison IMAC. La purification a été effectuée à une vitesse de 0.4 ml/min grâce à une pompe Econo Pump (Bio-Rad). Suivant un lavage avec 30 ml de tampon de liaison, la colonne a été éluée avec 30 ml de tampon de lavage IMAC. L'éluat récolté a été dilué dans un volume égal de tampon de liaison et a été à nouveau déposé sur une colonne de nickel équilibrée avec le même tampon. La colonne a été éluée avec un gradient constitué de tampon de liaison ayant une concentration d'Imidazole variant de 0 à 80 mM. Un collecteur de fraction (Bio-Rad) a permis de récolter 120 fractions de 250 µl. Les fractions récoltées ont été dosées selon la méthode de Bradford modifié en utilisant une courbe de BSA comme échelle puis celles ayant une concentration plus élevée en protéines ont été analysées sur gel de protéines. Les fractions ayant des scFvs purs ont été combinées et dialysées dans du PBS avec une cassette Slide-A-Lyzer de 10 kDa (Pierce).

2.5.5 Analyse protéique

La séparation des protéines sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE a été effectuée à l'aide d'un appareil Mini Protean II (Bio-Rad). Les gels d'entassements de 4% (p/v)

ainsi que les gels de séparations ont été préparés selon la méthode de Laemmli [73]. Les échantillons ont été bouillis 5 min à 95°C avec le tampon de dépôt avant d'être chargés dans les puits. Cinq µl de l'échelle de masse moléculaire BenchMark™ Prestained Protein Ladder (GibcoBRL) ont été chargés sur le gel. La migration des échantillons a été effectuée à 200 V pendant 45 min. Suite à la migration, le gel de polyacrylamide a été incubé 10 min, sous agitation, dans une solution d'imidazole (200 mM imidazole, 0.1% SDS). La coloration du gel a été effectuée par incubation de 1 min dans une solution de 200 mM de ZnSO₄ suivit de trois lavages avec de l'eau. Le gel a été décoloré en incubant celui-ci pendant 15 min dans le tampon de transfert.

Les protéines séparées sur gel de polyacrylamide ont été transférées avec le système Mini-transblot (Bio-Rad) sur une membrane de PVDF Immun-Blot (Bio-Rad) préalablement trempée dans le méthanol. Le transfert a été réalisé sous un courant constant de 100 V pendant 1 h dans du tampon de transfert. Les membranes de PVDF ont été bloquées à la température ambiante pendant 1 h sous agitation continue avec du TBS supplémenté de lait écrémé (5% p/v). Pour la révélation de protéines portant une étiquette E-tag, les membranes ont été incubées 1 h dans du TBS contenant 5% (p/v) de lait écrémé et 1.5 µg/ml d'anticorps anti-E tag (Amersham-Pharmacia Biotech). Les membranes ont été lavées 2 fois 12 min avec du TBST et une fois 12 min avec du TBS, puis incubées 1 h avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Chemicon International) dilué 1/50,000 dans du TBS contenant 10% de lait écrémé. Pour la révélation de protéines portant une étiquette de polyhistidine, les membranes ont été incubées 45 min avec un anticorps anti-polyhistidine conjugué à la peroxydase (Sigma) dilué 1/50,000 dans du TBST, puis lavées 2 fois 12 min avec du TBST, 12 min avec du TBS. Les membranes ont été incubées 5 min dans la solution de révélation SuperSignal (Pierce), exposées sur film à rayons-X (Konica) pour une période variant entre 15 sec et 20 min, puis le film a été révélé avec un appareil Mini-Medical/90 (AFP Imaging).

2.6 Culture cellulaire

2.6.1 Lignées cellulaires utilisées

Les cellules HeLa (#ATCC:CCL-2) et les cellules HEK-293 (#ATCC:CRL-1573) ont été maintenues dans un incubateur à 37°C avec 5% CO₂. Le milieu de culture utilisé a été du DMEM (BioWhittaker ou GibcoBRL) contenant 10% (v/v) de SVF

décomplémenté. Le milieu de culture a été additionné de 1% (v/v) d'un mélange comprenant de la glutamine, de la pénicilline et de la streptomycine (GibcoBRL).

2.6.2 Transfections stables

Entre 2 et 5 millions de cellules ont été utilisées pour chacune des transfections. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et resuspendues dans 500 µl de tampon d'électroporation. L'électroporation a été effectuée dans des cuvettes de 0.4 cm (Bio-Rad) avec 10 à 15 µg d'ADN préparé par maxi-préparation. Pour optimiser la transfection, l'ADN a préalablement été linéarisé par digestion enzymatique. Les cellules ont été électroporées à 960 µF et à 250 V sur un appareil Gene Pulser (Bio-Rad). Suite à l'électroporation, les cellules ont été incubées sur glace pendant 10 min avant d'être resuspendues dans 5 ml de milieu de culture. Les cellules ont été mises en sélection 24 h après l'électroporation par ajout de la drogue appropriée. 1 µg/ml de puromycine a été utilisés pour les cellules HeLa et les cellules HEK-293. La sélection à l'hygromycine de cellules HEK-293 a été effectuée avec une concentration de 100 µg/ml.

2.6.3 Analyse en cytométrie en flux

Au total, 4 à 6 x10⁵ cellules de HeLa transfectées avec les CMH I ont été utilisées pour chaque marquage. Les cellules ont été lavées deux fois avec 500 µl de PBS, puis l'anticorps primaire a été ajouté selon les conditions suivantes pour chacun des échantillons: 100 µl lorsqu'il s'agissait de surnageant d'hybridome et 0.3 µg dans un volume final de 50 µl de PBS lorsqu'il s'agissait des anticorps anti-souris-FITC H-2D^k et H-2K^k (Cedarlane). L'anticorps primaire a été incubé 30 min dans le noir à 4°C et les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS. Lorsqu'il s'agissait de surnageant, un anticorps secondaire était nécessaire, 1 µl d'anticorps anti-IgG de souris FITC (eBioscience) dans un volume final de 50 µl de PBS était alors utilisé pour chacun des échantillons. Après incubation de 30 min à 4°C dans le noir, les cellules ont été lavées avec du PBS et resuspendues dans 500 µl de PBS. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un cytofluorimètre Epics XL (Beckman-Coulter). Les cellules HeLa transfectées ont été triées afin d'obtenir une population de cellule exprimant un haut taux de CMH I. Environ 5 millions de cellules ont été triées pour chacune des transfections. Les cellules ont été marquées avec l'anticorps approprié puis triées sur

un cytofluorimètre Coulter Elite (Beckman-Coulter). Les cellules ayant un haut taux d'expression ont été récupérées et resuspendues dans 5 ml de DMEM.

2.6.4 Sélection de cellules résistantes à l'apoptose

Un million de cellules HEK-293 résistantes à l'hygromycine ont été traitées avec 2 μ l de FasL soluble recombinant ainsi que 4 μ l d'amplificateur (Alexis Biosciences). Après une incubation de 16 h dans du RPMI à 37°C, 5% CO₂, les cellules mortes non-adhérées ont été éliminées par aspiration. Les cellules vivantes ont été lavées avec du PBS et resuspendues dans du DMEM frais. Une deuxième ronde de sélection a été effectuée selon les mêmes conditions.

2.6.5 Microscopie à fluorescence

Des clones de cellules transfectées ont été isolés et transférés dans une plaque de 24 puits dans laquelle une lamelle circulaire avait déposée au fond de chaque puits. Les cellules ont été incubées dans du DMEM à 37°C pendant 16 à 18 h afin de permettre leur adhésion à la lamelle. Une fois adhérentes, 1 μ l/ml de GolgiPlugTM (PharMingen) a été ajouté pour une période de 4 à 6 h puis les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées pendant 10 min avec 200 μ l d'une solution de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde. La solution de fixation a été aspirée et les cellules ont été perméabilisées à -20°C avec 300 μ l de méthanol froid pendant 5 min avant d'être lavées avec 500 μ l de PBS. Les cellules ont ensuite été incubées une heure à la température ambiante avec 200 μ l d'une solution de blocage. Après aspiration de la solution, 1 μ g/ml de l'anticorps anti-FasL NOK-1 (eBioscience) dilué dans la solution de blocage a été ajouté et incubé à 4°C pour 16 à 18 heures. Suite à deux lavages avec 500 μ l de PBST, l'anticorps secondaire utilisé, un anti-IgG de souris conjugué à Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) et dilué 1/1,000 dans la solution de blocage, a été ajouté. Après incubation d'une heure à la température ambiante dans le noir, deux lavages au PBST ont été effectués suivit d'un lavage avec de l'eau. Les lamelles ont été déposées à l'envers sur une lame ayant une goutte de solution de montage (Geltol, 2.5% DABCO et 500 ng/ml de DAPI) puis séchées une heure à la température ambiante avant d'être observées au microscope à fluorescence.

3. RÉSULTATS

3.1 Clonage et transfection des molécules du CMH I

Les CMH I ayant été choisi comme cible pour fixer FasL aux greffes, des transfectants stables exprimants différents CMH I ont été construits afin de vérifier la spécificité de cet anticorps. Pour ce faire, les ADNs des chaînes lourdes des CMH I D^b, D^p, K^b, K^p, K^k et D^k ont été amplifiés par RT-PCR à partir d'ARN de splénocytes obtenu de souris B10.P (D^p et K^p), B6.AKR (K^k et D^k) ou C57/B6 (D^b et K^b). Les amorces 1 et 2 ont permis d'amplifier toutes les allèles à l'exception de l'allèle K^b. Deux nouvelles amorces (3 et 4) ont été synthétisées pour amplifier cette allèle. Suite au polissage des extrémités des produits de PCR, les ADNs ont été clonés dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO et transformés dans des bactéries Top 10. La présence d'insertion a été évaluée par digestion avec l'enzyme *EcoRI* qui flanque le site d'insertion puis des digestions analytiques ont été effectuées pour distinguer les différents haplotypes p, b et k. L'enzyme *PstI* a été utilisée pour discriminer D^b de K^b, *SacI* a permis de distinguer D^p de K^p et le patron de digestion *BglII* distingue K^k de D^k. Un clone de chacune des allèles a été amplifié et séquencé avec les amorces M13 universel, M13 reverse et 3'CMH I interne. Les séquences obtenues ont été comparées à la banque de données du NCBI et toutes les allèles étaient identiques aux séquences publiées à l'exception de D^k (# Accession AAB17605). La Figure 11 montre que la mutation retrouvée chez l'allèle D^k mène au changement d'une isoleucine vers une thréonine (ATT -> ACT) à l'acide aminé en position 20. Six clones indépendants de 2 PCR indépendants ont été séquencés afin de vérifier si cette mutation était le résultat d'une erreur de PCR. Cette mutation étant présente chez tous les échantillons séquencés, l'erreur de PCR a pu être exclue. Puisque ce changement est situé dans le peptide signal, il n'aura pas d'impact sur la forme mature de la protéine. De plus, les peptides signaux des allèles D^p et D^q sont identiques à la séquence retrouvée chez le mutant D^k, donc l'expression membranaire de la protéine ne devrait pas être affectée.

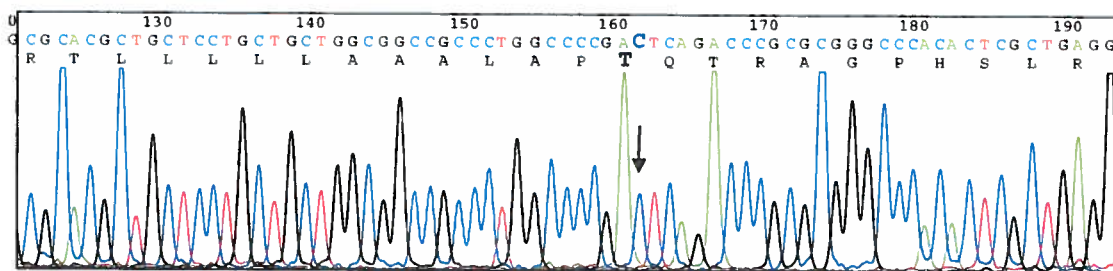


Figure 11. Séquence N-terminale du CMH I H-2D^k

Le séquençage de tous les clones obtenus du CMH I D^k montre la présence d'une mutation par rapport à la séquence présente dans la banque de données du NCBI.

Les ADN de K^k et K^b ont été isolés du vecteur pCR4Blunt-TOPO avec les sites *EcoRI* et *BamHI* présents sur les amorces ayant servi à l'amplification. Suite à une digestion avec ces enzymes, les fragments d'ADN ont été purifiés sur gel d'agarose et ligués au vecteur SR α puroMCS1 digéré avec ces enzymes. Le produit de ligation a été transformé en bactéries DH5 α puis les colonies obtenues ont été criblées avec les enzymes *EcoRI* et *BamHI*. Le séquençage des allèles D^b, D^p, K^p et D^k a révélé que le site de restriction *BamHI* qui devait être introduit par l'amorce d'amplification en 3' était absent, car les produits de PCR avaient été tronqués de 3 bases ce qui éliminait le site de restriction. Les ADNc ont donc été excisés en utilisant les sites de restrictions *EcoRI* qui flanquent le site d'insertion dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO. Suite à la digestion avec *EcoRI*, les ADNc ont été purifiés sur gel et ligués au vecteur SR α puroMCS1 digéré par *EcoRI* et déphosphorylé. Les produits de ligation ont été transformés en bactéries DH5 α puis les clones ont été criblés par digestion avec *EcoRI*. La polarité des insertions a été déterminée par digestion avec l'enzyme *BglII* pour D^b et D^p et avec *PstI* pour D^k et K^p. Un clone recombinant pour chacune des allèles a été amplifié par maxi-préparation. Les ADNc correspondant aux six allèles des CMH I ont été linéarisés avec les enzymes *BspHI* (D^b, D^p, K^p, K^k et D^k) ou *ScaI* (K^b) puis introduits par électroporation dans des cellules humaines n'exprimant pas de CMH I murin soit les cellules HeLa. Suite à la sélection en puromycine, les transfectants stables obtenus ont été utilisés pour confirmer la spécificité de l'anticorps B8-24-3 qui est sensé reconnaître les CMH I H-2^p et H-2^b, mais pas H-2^k.

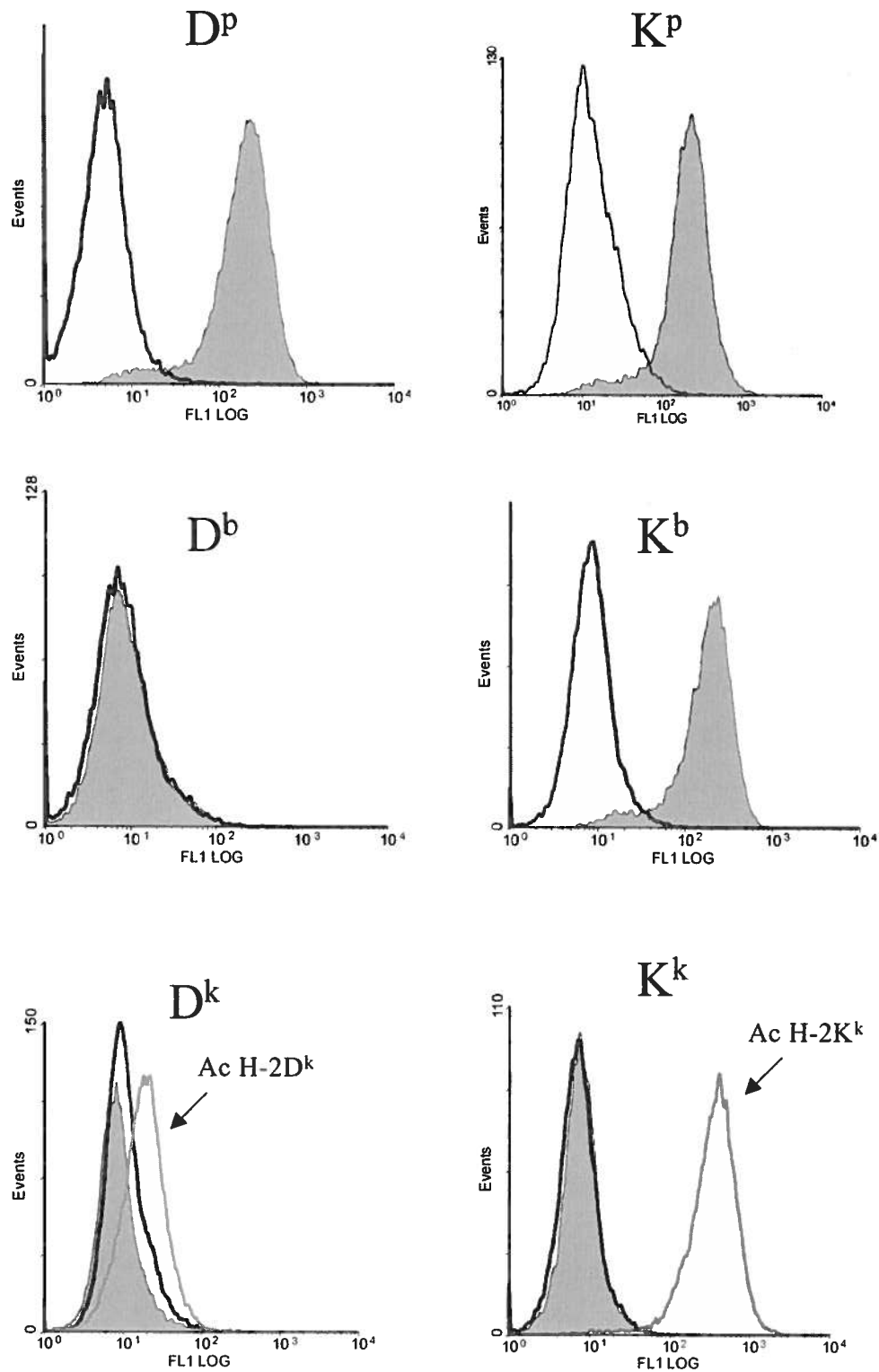


Figure 12. Analyse par FACS de la spécificité de l'anticorps B8-24-3

Les cellules HeLa transfectées avec les différentes allèles des CMH I ont été marquées avec l'anticorps B8-24-3 et un anticorps secondaire conjugués au FITC puis analysées en cytofluorométrie. Des anticorps directement conjugués FITC et spécifiques aux CMH I D^k et K^k ont été utilisés afin de vérifier l'expression de ces transfectants.

3.2 Confirmation de la spécificité de l'anticorps B8-24-3

Le but de ce projet consistait à induire l'immunoprivilège artificiel en ciblant FasL à des allogreffes. L'approche préconisée a été de construire des molécules chimériques composées de FasL fusionné à un scFv reconnaissant les CMH I des souris donneuses. Dans le modèle murin de rejet de greffe utilisé, les souris donneuses expriment les CMH I D^p et K^p ou D^b et K^b, tandis que les souris receveuses expriment K^k et D^k. L'hybridome sécrétant l'anticorps B8-24-3 a été obtenu d'ATCC et l'anticorps a été produit. Les populations de cellules HeLa transfectées avec les différents CMH I ont été marquées avec l'anticorps B8-24-3 et un anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué au FITC, puis analysées en cytofluorométrie en flux. Des anticorps spécifiques à D^k et K^k directement conjugués au FITC ont aussi été utilisés. La Figure 12 montre que l'anticorps B8-24-3 (en gris) reconnaît les molécules K^b, D^p et K^p et ne reconnaît pas D^k et K^k. L'expression des CMH I D^k et K^k par les cellules HeLa a été confirmée grâce à des anticorps spécifiques (anti-D^k et anti-K^k). En ce qui concerne D^b, l'anticorps B8-24-3 ne semble pas reconnaître cette allèle. Afin de confirmer que les cellules HeLa transfectées avec le CMH I H-2D^b exprimaient l'allèle, un RT-PCR qualitatif a été effectué sur les transfectants.

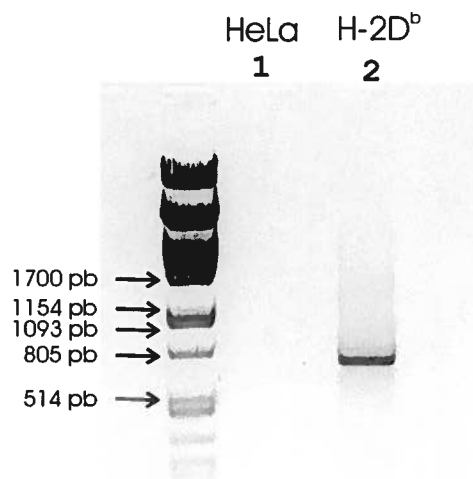


Figure 13. Évaluation de l'expression de H2-D^b par RT-PCR

Les cellules transfectées avec l'allèle H-2D^b ont été analysées par RT-PCR et comparé à celui obtenu avec des cellules HeLa non-transfectées.

La Figure 13 montre que le RT-PCR avec les amorces 1 et 30 confirme la présence de l'ADNc de D^b chez les transfectants. Le niveau d'expression des différents ADNc était similaire chez tous les transfectants, ce qui suggère que l'anticorps B8-24-3 reconnaît mieux D^p et K^b que K^p, puisque le marquage était beaucoup plus intense chez ces transfectants. De surcroît, le faible déplacement observé avec l'anticorps anti-D^k commercial est probablement lié à sa faible affinité puisque les transfectants expriment des niveaux comparables d'ADNc.

3.3 Clonage et expression de scFv dans le vecteur pCANTAB 5E

Ayant confirmé que l'anticorps B8-24-3 possédait la spécificité désirée, un scFv a été construit à partir de l'ARN extrait de l'hybridome sécrétant l'anticorps. Les chaînes variables lourdes et légères de l'anticorps ont été amplifiées individuellement par PCR à partir d'ADNc obtenu suite à l'extraction d'ARN de l'hybridome. Puisque la séquence en acides aminés de l'anticorps était inconnue, des oligonucléotides dégénérés pouvant amplifier n'importe quelle chaîne lourde et légère ont été dessinés. Les amorces 5 et 8 ont été utilisées pour amplifier la chaîne lourde et les amorces 6 et 7 pour amplifier la chaîne légère. Le vecteur d'expression bactérien choisi, le pCANTAB 5E (Amersham-Pharmacia), possède des sites de clonage *Sfi*I et *Not*I pour l'expression périplasmique de scFvs ou pour l'expression sur phage filamenteux. Un site de restriction *Sfi*I en N-terminal de la chaîne lourde et un site de restriction *Not*I en C-terminal de la chaîne légère ont été inclus dans les amorces. Une charnière de 15 acides aminés composée du motif (Gly₄Ser)₃ a été sélectionnée pour l'assemblage du scFv. Suite au RT-PCR, les extrémités saillantes des deux chaînes ont été polies et clonées dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO. Les clones recombinants ont été identifiés par digestion avec l'enzyme *Eco*RI et trois clones de chacune des chaînes ont été séquencés avec les amorces M13 universel et M13 reverse. Les séquences obtenues pour chacune des chaînes étaient identiques et démontrent que l'anticorps B8-24-3 est composé d'une chaîne légère κ12 (Figure 14 a) et d'une chaîne lourde V14 (Figure 14 b).

Q V K L Q E S G A E F V R P G A S V K L
CAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGTTTGTGAGGCCAGGGCCTCAGTCAAGTT

CDR1

S C T A S G F N I K D D Y M F W V K Q R
GTCCTGCACAGCTTCTGGCTTTAACATTAAAGACGACTATATGTTTTGGGTGAAACAGA

CDR2

P E Q G L E W I G W I A P D N G D T E
GGCCTGAGCAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGCTCCTGACAATGGTGATACTGAA

Y A S K F Q G K A T I T A D T S S N T A
TATGCCTCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGC

Y V Q L S S L T S E D T A V Y Y C T T W
CTACGTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTACTACAT

CDR3

G Y Y S Y V N Y W G Q G T T V T V S S
GGGGTTACTATAGTTACGTAAACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Figure 14 a. Séquence de la région VL de l'anticorps B8-24-3

D I Q M T Q S P A S L S A S V G E T V T
GACATCCAGATGACTCAATCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCAC

CDR1

I T C R A S G N I H N Y L A W Y Q Q K Q
CATCACATGTGAGCAAGTGGGAATATTCACAATTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAAC

CDR2

G K S P Q L L V Y N A K T L A N D V P
AGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTTTATAATGCAAAAACCTTAGCAAAATGATGTGCCA

S R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q
TCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTACA

CDR3

P E D F G S Y Y C Q H F W S T P W T F G
ACCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTTGGAGTACTCCGTGGACGTTCC

G G T K L E L K R
GTGGAGGCACCAAGCTGGAACCTCAAACGT

Figure 14 b. Séquence de la région VH de l'anticorps B8-24-3

Le séquençage des chaînes variables de l'anticorps B8-24-3 a permis de déterminer la séquence en acides aminés des chaînes variables. La chaîne légère est une κ 12 alors que la chaîne lourde est une V14. Les trois régions CDR sont soulignées.

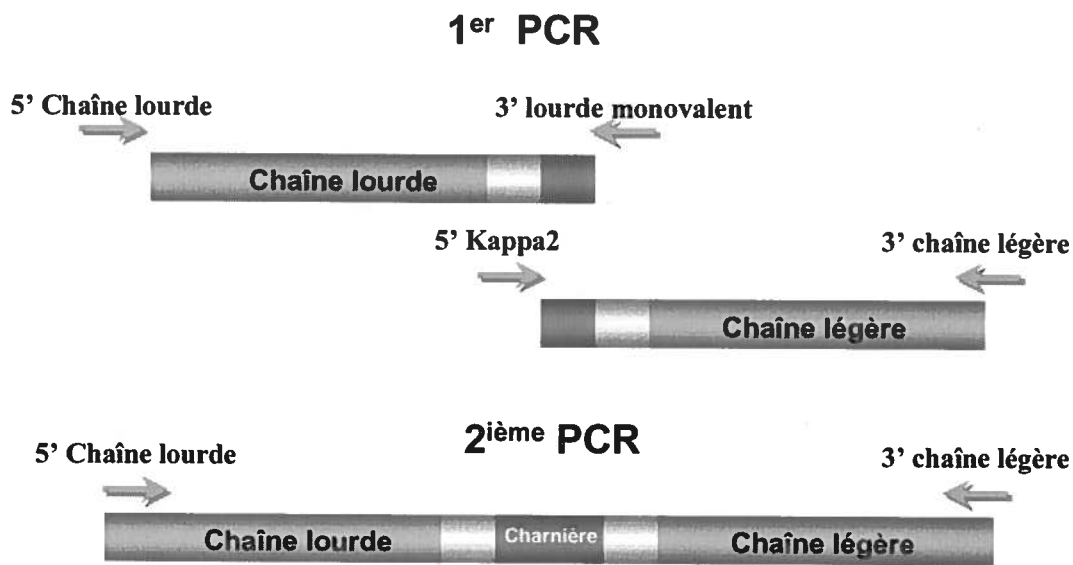


Figure 15. Principe de l'assemblage par PCR des scFvs

L'assemblage des scFvs a été effectué par deux PCR consécutifs. Les premiers PCR ont amplifiés séparément les chaînes lourdes et légères ayant une région complémentaire au niveau de la charnière. Le second PCR d'assemblage a été effectué en utilisant les amorces situées aux extrémités.

La Figure 15 illustre le principe des étapes de PCR effectuées pour assembler le scFv. D'abord un premier PCR a été effectué avec les amorces ayant servi à amplifier les chaînes individuelles, mais en utilisant les clones dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO comme matrices. Suite à la purification des fragments d'ADN sur gel d'agarose, un second PCR avec les amorces situées en 5' et 3' (amorces 5 et 6) a été effectué et l'assemblage a lieu grâce aux parties complémentaires présentes sur la charnière des deux chaînes. Le scFv assemblé a été poli, purifié sur gel d'agarose puis cloné dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO. Les colonies ont été criblées avec *EcoRI* et les clones positifs ont été séquencés avec les amorces M13 universel et M13 reverse. Un scFv assemblé ayant la charnière flexible de quinze acides aminés a ainsi été obtenu.

Le scFv assemblé a été isolé de pCR4Blunt-TOPO par digestion avec *SfiI* et *NotI*, purifié sur gel d'agarose, et ligé au vecteur pCANTAB 5E digéré par ces mêmes enzymes. Une digestion *NcoI* a été effectuée post-ligation pour réduire le nombre de colonies portant un vecteur sans insertion. Après transformation en bactéries DH5 α , les clones recombinants ont été identifiés par digestion *HindIII* et *BamHI*. Malgré

plusieurs tentatives de clonage, seulement trois clones recombinants ont pu être obtenus et le séquençage des clones a démontré que tous avaient subi une délétion de 4 pb au niveau du site *SfiI*. (Figure 16). Cette délétion perturbe le cadre de lecture du scFv et génère une protéine non-fonctionnelle.

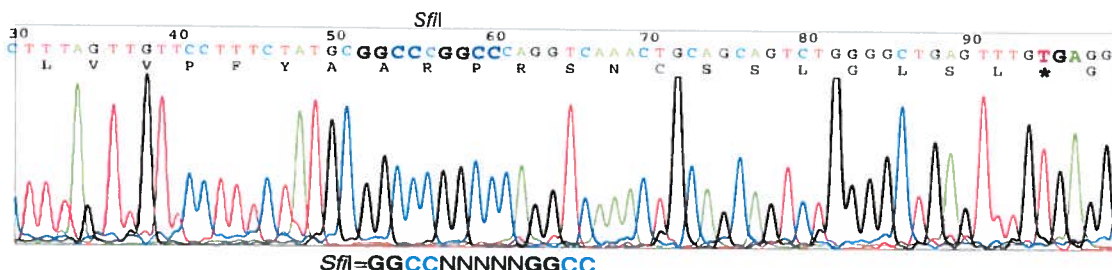


Figure 16. Délétion observée chez les scFvs dans pCANTAB 5E

Trois clones seulement ont été obtenus lors du clonage des scFvs dans le vecteur pCANTAB 5E. Les trois clones présentait tous une délétion de 4 pb au niveau du site de restriction *SfiI*, ce qui perturbait le cadre de lecture.

L'échec de clonage du scFv dans pCANTAB 5E a initialement été attribué à des difficultés de digestion par l'enzyme *SfiI*. Le site de restriction *SfiI* a donc été remplacé par un site *FseI*, tel qu'illustré à la Figure 17. Pour ce faire, un PCR a été effectué avec les amorces 18 et 19 en utilisant un des clones portant la délétion de 4 pb comme matrice. Le fragment d'environ 150 pb obtenu suite au PCR permettait l'incorporation d'un site *FseI* de 8 pb, remplaçant le site *SfiI* et rétablissant le cadre de lecture du scFv. Les extrémités du produit de PCR ont été polies, purifiées sur gel d'agarose, puis l'ADN a été cloné dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO. Un clone recombinant a été identifié par digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* et séquencé avec l'amorce M13 reverse. Le fragment a ensuite été isolé du vecteur pCR4Blunt-TOPO par digestion avec *HindIII* et *PstI* et purifié sur gel d'agarose. Parallèlement, le clone ayant servi de matrice au PCR a été digéré par ces mêmes enzymes et purifié sur gel d'agarose avant d'être ligué au produit de PCR (Figure 17). Le produit de ligation a été transformé en bactéries DH5 α et les clones recombinants ont été criblés avec les enzymes *NgoMIV* et *BamHI*.

Les clones ont été séquencés avec l'amorce 5' Lac pCANTAB et il s'est avéré que tous avaient subi des mutations introduisant des codons de terminaison ou des délétions perturbant le cadre de lecture du scFv. Le seul clone obtenu portant un scFv sans mutation (clone #21) possédait un fragment d'ADN *PstI* surnuméraire provenant d'une

digestion partielle du pCR4Blunt-TOPO portant le scFv de départ. Ce fragment additionnel perturbait aussi le cadre de lecture du scFv dans pCANTAB 5E. Afin d'éliminer le fragment surnuméraire et de générer un scFv fonctionnel, une digestion *Pst*I et une ligation intra-moléculaire ont été effectuées. Une digestion *Pme*I (présent dans le fragment *Pst*I) a été effectuée post-ligation pour éliminer le vecteur parental. Aucuns clones recombinants n'ont pu être obtenus et ce malgré plusieurs tentatives.

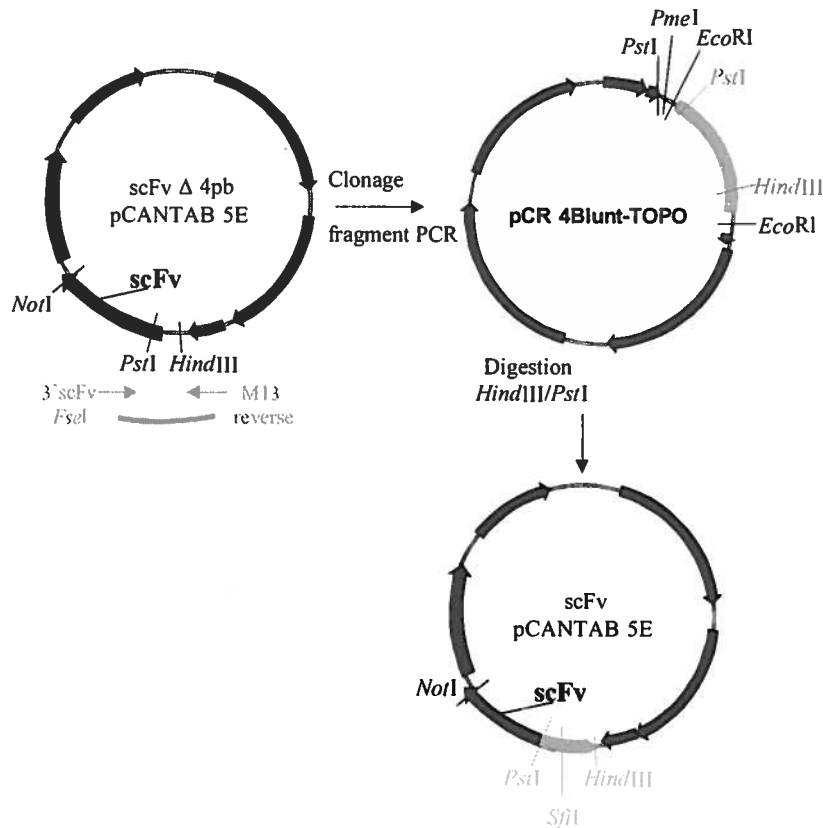


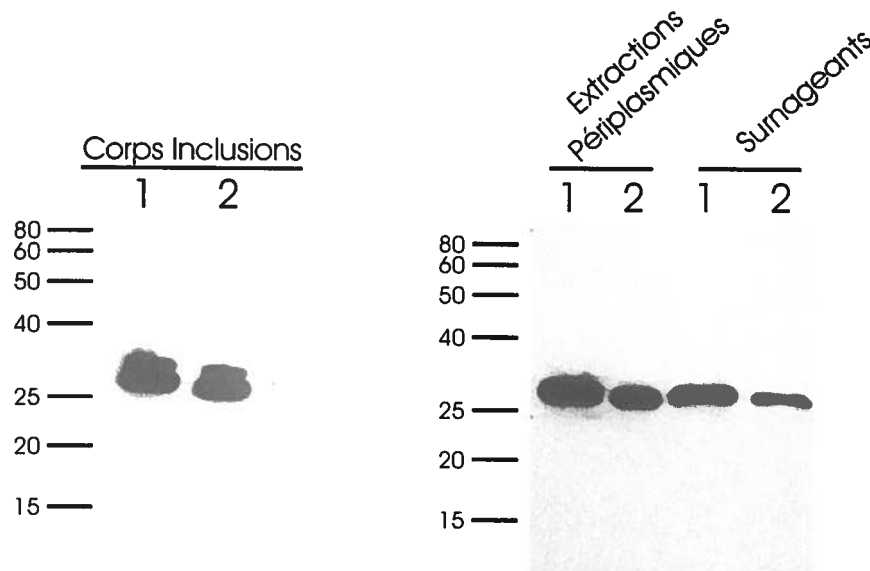
Figure 17. Introduction d'un site *Fse*I dans pCANTAB 5E

Un des clones portant la délétion de 4 pb a été utilisé comme matrice de PCR afin de convertir le site *Sfi*I en site *Fse*I. Le fragment obtenu a d'abord été cloné dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO. Suite à la digestion par les enzymes *Hind*III et *Pst*I, ce fragment a été introduit dans pCANTAB 5E ayant un scFv muté.

Il semblait impossible de cloner le scFv dérivé de l'anticorps B8-24-3 dans pCANTAB 5E, les seuls clones obtenus étant non-fonctionnels. Il devenait apparent que ce scFv était toxique aux bactéries et la pression sélective induisait l'apparition de mutations. L'expression de scFvs dans pCANTAB 5E est régulée par le promoteur

lac, un promoteur actif en absence d'inducteur. Il est possible de réduire la transcription issue du promoteur *lac* lorsque les bactéries expriment le répresseur codé par le gène *lacI^q*, mais malgré la présence de *LacI^q*, le promoteur *lac* peut être actif. Le promoteur *lac* étant sensible à la répression catabolique, l'ajout de glucose au milieu permet de réduire le taux basal de transcription [53]. La tentative de correction du clone #21 a été de nouveau effectuée en utilisant la souche bactérienne XL1-Blue qui exprime le répresseur *lacI^q* et en ajoutant au milieu de culture du glucose. Grâce à ceci, il a été possible d'effectuer la délétion du fragment *PstI* du clone #21 et le séquençage des clones obtenus a confirmé qu'un scFv sans mutation ou délétion avait été obtenu. Les clonages subséquents de scFvs ont donc été effectués en bactéries XL1-Blue en présence de glucose.

Le scFv B8-24-3 cloné dans pCANTAB 5E a été transformé par électroporation en bactéries HB2151. Cette souche possède le répresseur *lacI* et est non-suppressive, ce qui permet l'expression périplasmique de scFvs. Des cultures bactériennes de 30 ml ont été effectuées puis induites à l'IPTG. Le surnageant, le périplasma et les corps d'inclusion ont été analysés pour détecter la localisation des scFvs. La Figure 18 montre l'analyse par immunobuvardage de type Western des différentes fractions. Le scFv a été détecté dans le périplasma, mais aussi dans le surnageant et les corps d'inclusions. Les scFvs sont présents dans le surnageant seulement lors d'une incubation prolongée (16 à 18 heures). Les scFvs étant toxiques aux bactéries, une induction prolongée entraîne la lyse bactérienne et la libération du contenu intracellulaire dans le milieu. Afin de minimiser la présence des scFvs dans les corps d'inclusion, la température de production a été réduite à 30°C, ce qui favorise l'expression de scFvs solubles [120]. Une cinétique a été effectuée afin de déterminer le temps optimal d'induction et les aliquots ont été analysés par immunobuvardage de type Western avec un anticorps spécifique à l'étiquette E. Ceci a permis de déterminer que le temps optimal d'induction était de trois heures.



1=scFv divalent 2= scFv trivalent

Figure 18. Analyse de l'expression des scFvs par immunobuvardage

Suite à l'induction de la production des scFvs en bactéries, la localisation intracellulaire des scFvs a été évaluée. Le surnageant, les fractions périplasmiques et les corps d'inclusions ont été analysés sur un gel de polyacrylamide puis révélés par immunobuvardage avec un anticorps spécifique à l'étiquette E.

3.4 Génération de scFvs de valence différente

Des scFvs divalents et trivalents ont été générés afin d'augmenter l'avidité du scFv envers son antigène. De plus, l'oligomérisation de FasL étant essentiel pour induire l'apoptose, les scFvs dimériques et trimériques devraient forcer l'oligomérisation de FasL. Des scFvs dimériques et trimériques ont été créés en introduisant une charnière plus courte. Ainsi, la charnière de 15 acides aminés a été remplacée par une charnière de 7 acides aminés (Gly₆Ser) pour former un scFv divalent et par une charnière de 1 acide aminé (Gly) pour former un scFv trivalent. L'utilisation de scFvs associés en dimères ou en trimères forcera l'oligomérisation de FasL lors de la production des chimères scFv-FasL.

Les scFvs divalents et trivalents ont été construits par PCR de façon identique au scFv monovalent en utilisant des amorces ayant des charnières plus courtes. Les chaînes variables du scFv divalent ont été amplifiées individuellement avec les amorces 6 et 9 (chaîne légère) et les amorces 5 et 10 (chaîne lourde). Les deux chaînes

ont été purifiées sur gel d'agarose puis l'assemblage a été effectué par PCR avec les amorces 5 et 6. Suite à l'assemblage, les extrémités saillantes ont été polies et les scFvs ont été purifiés sur gel d'agarose avant d'être clonés dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO. Le scFv trivalent a été amplifié avec les amorces 6 et 11 (chaîne légère) et les amorces 5 et 12 (chaîne lourde) suivit d'un PCR d'assemblage (figure 15) avec les amorces 5 et 6. Suite au clonage dans pCR4Blunt-TOPO, les scFvs divalents et trivalents ont été séquencés avec les amorces M13 universel et M13 reverse avant d'être transférés dans le vecteur pCANTAB 5E. Le scFv divalent ne présentait aucune erreur tandis que le scFv trivalent possédait deux mutations en C-terminal (E→A et R→L) (Figure 19). Lors du transfert du scFv trivalent du vecteur pCR4Blunt-TOPO au vecteur pCANTAB, il a été possible de corriger ces deux mutations grâce au site de restriction *HincII* unique présent dans tous les scFvs dérivés de l'anticorps B8-24-3. Pour ce faire, le scFv trivalent a été cloné en fusion avec le scFv monovalent déjà présent dans le vecteur pCANTAB 5E.

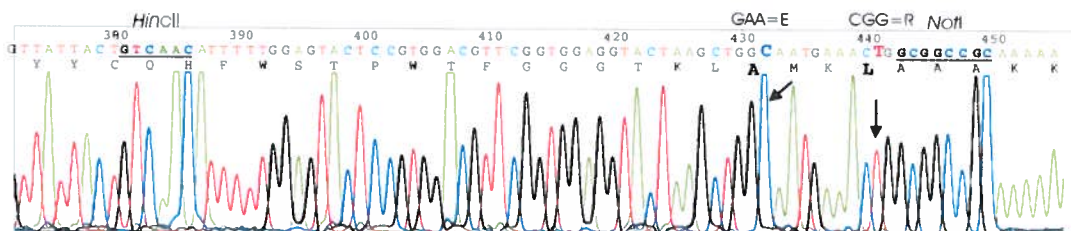


Figure 19. Mutations C-terminales du scFv trivalent

Le séquençage du scFv trivalent cloné dans le vecteur pCR4Blunt-TOPO a démontré la présence de deux mutations C-terminales.

Le scFv divalent a été isolé du vecteur pCR4Blunt-TOPO par digestion avec *PstI* et *NotI* et purifié sur gel d'agarose. En parallèle, le vecteur pCANTAB 5E contenant le scFv monovalent a été digéré avec ces mêmes enzymes puis purifié sur gel d'agarose. Le fragment de 687 pb correspondant au scFv divalent a été ligué au vecteur pCANTAB 5E purifié et transformé par électroporation en bactéries XL1-Blue. Les clones recombinants ont été identifiés par digestion avec les enzymes *PstI* et *EagI* et séquencés avec les amorces B1 et R2. Le scFv trivalent a été cloné de manière identique au scFv divalent excepté que les enzymes *PstI* et *HincII* ont été utilisés pour corriger les mutations détectées lors du séquençage.

3.5 Construction du vecteur pCANTAB 6H et clonage des scFvs

La purification de protéines via l'étiquette E nécessite des conditions d'éluion extrêmes pouvant entraîner la dénaturation des scFvs. Afin de remédier à ce problème, l'étiquette E présente dans pCANTAB 5E a été remplacée par une étiquette de poly-histidine, générant le vecteur pCANTAB 6H (Figure 20). Pour ce faire, un PCR avec les amorces 13 et 32 a été effectué en utilisant pCANTAB 5E comme matrice. Le fragment de 1300 pb obtenu a été purifié sur gel d'agarose avant d'être digéré avec les enzymes *EcoRI* et *NotI*. Parallèlement, le vecteur pCANTAB 5E a été digéré avec ces mêmes enzymes et le fragment d'ADN de 1300 pb y a été ligué. Le produit de ligation a été transformé par en bactéries DH5 α et un clone recombinant correspondant au vecteur pCANTAB 6H a été identifié. Ce clone a été amplifié par maxi-préparation et utilisé pour les clonages ultérieurs. Les scFvs (monovalent, divalent et trivalent) ont été excisés de pCANTAB 5E par digestion avec *HindIII* et *NotI* et purifiés sur gel d'agarose. Le vecteur pCANTAB 6H a été digéré avec ces même enzymes et les différents scFvs y ont été ligués puis les produits de ligations ont été transformés par électroporation en bactéries XL1-Blue. Une double digestion avec *PstI* et *BamHI* a permis d'identifier un clone recombinant pour chacun des scFvs.

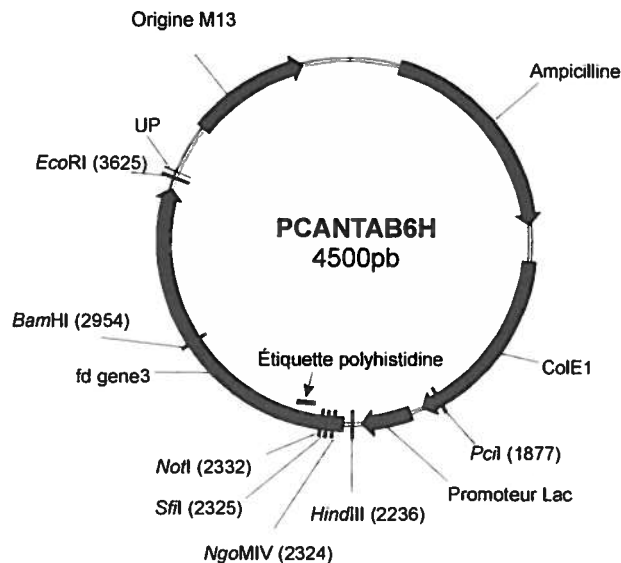


Figure 20. Représentation du vecteur pCANTAB 6H

3.6 Augmentation de la stabilité des scFvs

Il a été observé que le rendement du scFv monovalent était toujours inférieur à celui des scFvs divalents et trivalents (résultats non-présentés). Les amorces utilisées lors de l'assemblage par PCR des trois scFvs étant dégénérées, des différences en acides aminés ont été introduites dans les régions N-terminales des chaînes variables lourdes et légères. Grâce à la base de données International Immunogenetics Database (<http://imgt.cines.fr>), il avait été déterminé que l'anticorps B8-24-3 était composé d'une chaîne lourde V14 et d'une chaîne légère κ 12 (Figures 13 et 14). La Figure 21 montre la composition en acides aminés des différents scFvs par rapport aux séquences génomiques V14 et κ 12.

	Chaîne lourde	Chaîne légère
Monovalent	<u>Q</u> V <u>K</u> L <u>Q</u> E <u>S</u> G <u>A</u> <u>A</u>	D <u>I</u> V <u>L</u> N <u>Q</u> S
Divalent	<u>Q</u> V <u>K</u> L <u>Q</u> Q <u>S</u> G <u>A</u> E	D <u>I</u> V <u>M</u> T <u>Q</u> S
Trivalent	<u>Q</u> V <u>K</u> L <u>Q</u> Q <u>S</u> G <u>A</u> E	D <u>I</u> Q <u>M</u> T <u>Q</u> S
Séquence génomique	E <u>V</u> Q <u>L</u> Q <u>Q</u> S <u>G</u> A <u>E</u>	D <u>I</u> Q <u>M</u> T <u>Q</u> S
	Lourde V14	Légère κ12

Figure 21. Mutations introduites chez les scFvs par les amorces dégénérées

L'utilisation d'oligonucléotides dégénérés pour amplifier les trois types de scFvs a mené à l'introduction des mutations par rapport à la séquence génomique.

La Figure 21 montre que le scFv monovalent diverge des séquences génomiques par sept différences alors que les scFvs divalent et trivalent possèdent respectivement trois et deux différences. Il a été démontré que des scFvs plus stables peuvent mener à un rendement plus élevé en bactéries en diminuant la formation de corps d'inclusion [134]. Ceci pourrait expliquer le rendement inférieur observé avec le scFv monovalent dont la séquence s'éloigne le plus de la séquence génomique. Les scFvs ont donc été mutées par PCR afin d'être identiques aux séquences génomiques. Des PCR ont été effectués avec les amorces 24 et 25 pour le scFv monovalent et les amorces 24 et 41 pour le scFv divalent en utilisant les scFvs dans pCANTAB 6H comme matrice (Figure 22). Les fragments d'ADN obtenus ont été digérés avec *Pci*I, purifiés sur gel d'agarose, et ligués au vecteur pCANTAB 6H digéré par *Pci*I

possédant les scFvs instables. Puisque seul le séquençage permettait de distinguer les clones mutés des clones parentaux, deux clones ont été séquencés avec les amorces M13 reverse et S6 et un clone ayant les mutations désirées (pour les scFvs monovalent et divalent) a été identifié. La correction de la chaîne lourde a été effectuée par PCR de façon identique pour chacun des scFvs tel qu'illustré dans la Figure 15. Un PCR avec les amorces 26 et 27 a été effectué avec le scFv ayant la chaîne légère optimisée comme matrice. Le fragment d'ADN obtenu a été digéré avec *NgoMIV* et *SnaBI*, purifié sur gel d'agarose et ligué au vecteur pCANTAB 6H ayant la chaîne légère optimisée pour insert. Les clones recombinants ont été analysés par digestion avec *EagI* car les corrections introduisaient ce site de restriction, puis ont été séquencés avec l'amorce M13 reverse pour confirmer la présence des mutations.

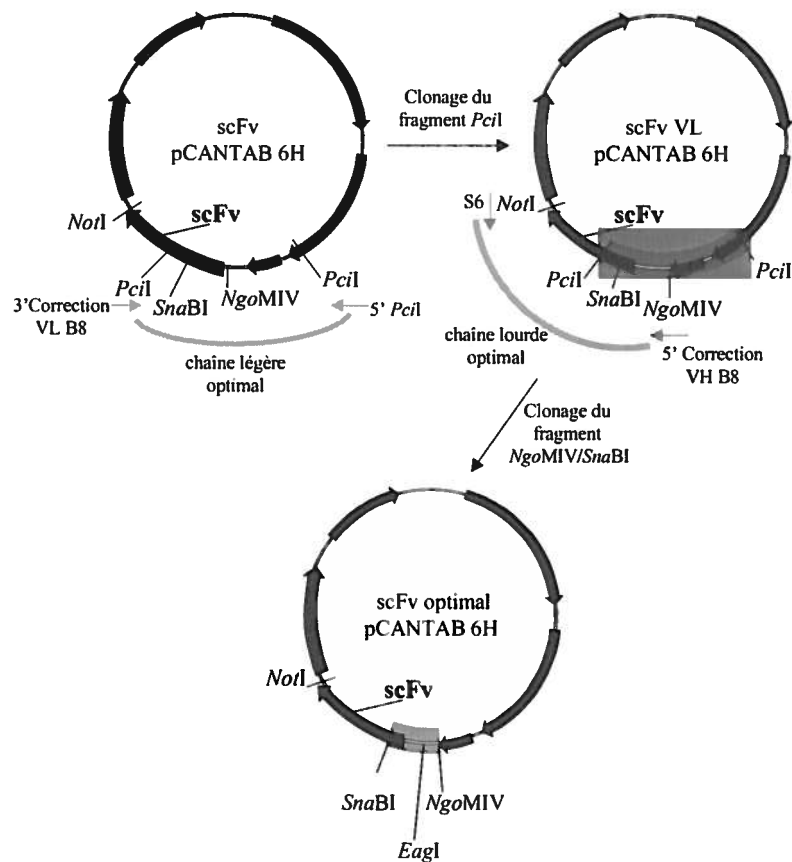


Figure 22. Introduction des séquences génomiques dans les scFvs

Afin d'introduire les séquences génomiques, des PCR de corrections ont été effectués. Un premier PCR sur le scFv monovalent et divalent a été effectué et le fragment obtenu a permis la correction de la chaîne légère. Suite à la correction de la chaîne légère, un second PCR a été effectué sur les scFvs monovalents, divalents et trivalents pour corriger la chaîne lourde.

Le rendement des scFv originaux et optimisés a été comparé. La production de scFv a été induite par ajout d'IPTG à des cultures de même densité optique. Des aliquots ont été récoltés à différents temps, les extractions périplasmiques effectuées, puis analysés par immunobuvardage avec un anticorps anti-poly-histidine.

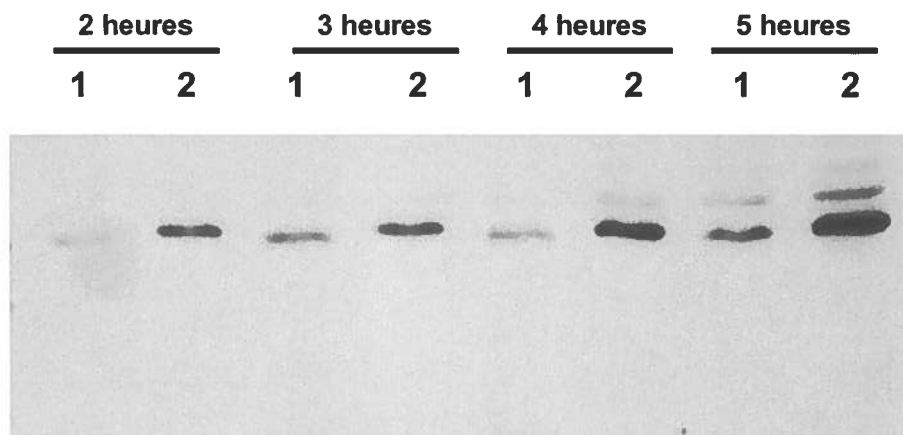


Figure 23. Influence de l'optimisation sur le rendement en scFv

1. scFv monovalent muté; 2. ScFv monovalent corrigé

Deux cultures bactériennes de même densité optique ont été induites à l'IPTG pour la production de scFvs. Des extractions périplasmiques effectuées à différents temps ont été analysées par immunobuvardage avec un anticorps anti-polyhistidine.

La Figure 23 montre la nette augmentation de rendement chez le scFv possédant les séquences génomiques. Cependant, une forte quantité de scFvs s'accumulait dans le cytosol bactérien (résultats non-présentés), suggérant que le peptide signal était mal reconnu. Dans le vecteur pCANTAB 5E, le gène III de M13 a été cloné dans le même cadre de lecture que le *lacZ* présent dans le vecteur pUC118 [97]. La Figure 24 montre que le codon d'initiation GTG du gène III est précédé par le codon d'initiation de *lacZ*, ce qui pourrait affecter la reconnaissance efficace du peptide signal. L'analyse de la qualité du peptide signal produit par initiation au niveau de l'ATG de *lacZ* avec le logiciel SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), confirme que celui-ci est inefficace pour la translocation de scFvs vers le périplasmique bactérien. De plus, le clivage du peptide signal semble être affecté et expliquerait la présence de doublet dans la figure 18. Cette bande minoritaire légèrement supérieure à celle correspondant au scFv indique clairement l'absence du clivage du peptide signal

été récoltés à différents temps post-induction. Suite à l'extraction périplasmique, les protéines ont été analysées par immunobuvardage avec un anticorps anti-polyhistidine. La Figure 25 montre que la production est nettement supérieure avec pLEX et que le doublet présent avec pCANTAB 6H est absent avec pLEX. L'expression du scFv avec pCANTAB 6H atteint son maximum après 2 heures d'induction et chute dramatiquement par la suite. Puisque pCANTAB 6H possède toujours le peptide signal non-optimal, il est possible que cette chute de rendement soit due à une toxicité liée à l'accumulation du scFv en corps d'inclusion. Le taux d'expression du scFv augmente continuellement avec pLEX suite à l'induction alors que le taux basal d'expression est nul en absence d'inducteur. Le promoteur plus étanche du vecteur pLEX semble donc supérieur pour la production de protéines toxiques comme semble l'être le scFv B8-24-3.

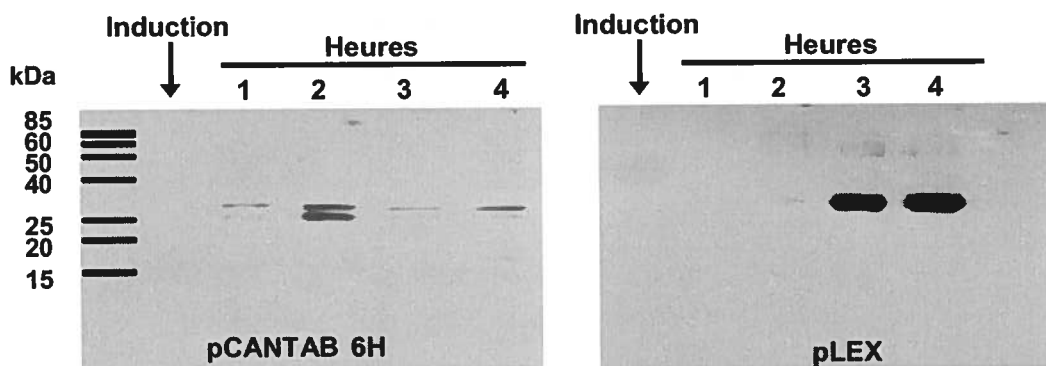


Figure 25. Rendement comparatif de scFvs entre pCANTAB 6H et pLEX
 Deux cultures bactériennes de même densité optique ont été induites à l'IPTG (vecteur pCANTAB 6H) ou au tryptophane (vecteur pLEX). Des extractions périplasmiques effectuées à différents temps ont été analysées par immunobuvardage avec un anticorps anti-polyhistidine.

3.8 Production de scFvs en bactéries

Une culture de 4 litres de bactéries GI724 transformées avec le scFv monovalent cloné dans pLEX a été effectuée. Suite à une induction au tryptophane de 4 heures, des extractions périplasmiques ont été effectuées et les scFvs ont été purifiés par colonne d'affinité Ni-NTA. Le scFv a été élué avec un gradient linéaire d'Imidazole de 0 à 80 mM et les 120 fractions récoltées ont été analysées sur gel SDS-PAGE de 12 %. Les fractions 80 à 100 contenant le scFv (Figure 26) ont été combinées, dialysées contre du PBS, puis dosées par la méthode de Bradford. Le rendement total obtenu a été de 35 µg de scFv.

Fractions récoltées

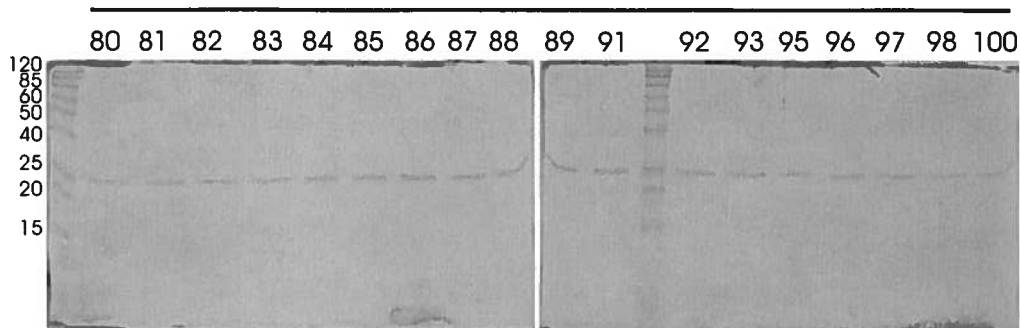


Figure 26. Identification des fractions contenant le scFv purifié

Suite à la purification par colonne Ni-NTA du scFv monovalent, les différentes fractions récoltées ont été analysées sur un gel de polyacrylamide et révélés par coloration au bleu de coomassie. Les fractions 80 à 120 contenaient la bande majeure correspondant au scFv.

3.9 Construction d'un vecteur pour expression en cellules eucaryotes

FasL requiert d'être glycosylé pour sa stabilité et son expression [96], ce qui nécessite son expression en cellules eucaryotes. Le vecteur pDisplay (Figure 7) a été sélectionné car il possède le peptide signal eucaryote IgGk et le gène de résistance au G-418 pour la sélection des transfectants. Puisque *Bam*HI devait être utilisé pour le clonage de FasL et que pDisplay contient deux sites *Bam*HI (683 et 853), le site présent à la position 683 a été éliminé. Suite à une digestion *Hind*III et *Eco*RV, les extrémités ont été polies et une ligation intra-moléculaire a été effectuée. Les clones positifs ont été identifiés par PCR avec les amorces T7 et BGH reverse, puis une charnière permettant d'unir les scFvs à FasL a été introduite dans le vecteur. Cette charnière est constituée du motif GGGGS, suivi des sites de restriction *Bsp*EI et *Bam*HI pour l'introduction de FasL, puis un codon de terminaison (Figure 27). Les oligonucléotides 14 et 15 ont été hybridés ensemble et ligués au site *Not*I du vecteur pDisplay modifié. Les clones recombinants ont été identifiés par PCR avec les amorces 15 et 37 et la polarité des inserts a été déterminée par séquençage avec l'amorce T7.

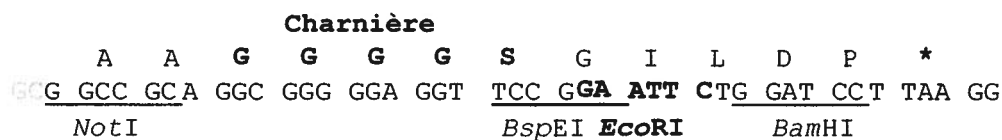


Figure 27. Séquence de la charnière unissant les scFvs à FasL

Une charnière Gly₄Ser a été introduite dans le vecteur pDisplay par clonage d'oligonucléotides complémentaires. Les oligonucléotides comportaient des sites de restrictions permettant le clonage de FasL.

Le vecteur pDisplay possédait une étiquette HA située immédiatement après le peptide signal et les étiquettes N-terminales peuvent empêcher la reconnaissance antigénique par les scFvs [41]. L'étiquette HA a été éliminée et un site *FseI* introduit par PCR sur le pDisplay modifié avec les amorces 16 et 17. Le fragment obtenu a été cloné dans pCR4Blunt-TOPO, les clones recombinants ont été identifiés par digestion avec *EcoRI*, puis séquencés avec les amorces 18 et 32. Ce fragment a été excisé de pCR4Blunt-TOPO par digestion avec *SnaBI* et *BglIII* et réintroduit dans le pDisplay modifié digéré avec ces enzymes. Une digestion *ApaI* a été effectuée post-ligation pour éliminer le vecteur parental, puis le tout a été transformé en bactéries DH5 α . Les clones obtenus ont été criblés avec *NdeI* et *EcoRI* et le vecteur résultant a été utilisé pour cloner les chimères scFv-FasL.

Les scFvs (monovalent, divalent et trivalent) possédant les séquences génomiques ont été excisés de pCANTAB 6H par digestion avec *FseI* et *NotI*, purifiés sur gel d'agarose et ligués au pDisplay modifié digéré par ces mêmes enzymes. Le site *NotI* étant situé immédiatement après le domaine transmembranaire présent dans le vecteur original, ceci permettait de l'éliminer. Les produits de ligation ont été transformés en bactéries DH5 α , les colonies obtenues ont été criblées par digestion avec *EcoRI* et *PstI*, puis séquencés avec les amorces 36 et 37. L'ADNc complet du FasL humain était déjà disponible au laboratoire. Puisqu'un site *BspEI* existe naturellement à la jonction transmembranaire de FasL, la portion extracellulaire a été isolée par digestion *BspEI* et *BamHI*, purifié sur gel d'agarose et ligué aux mêmes sites de pDisplay contenant les différents scFvs. Une digestion post-ligation avec *EcoRI* a été effectuée afin d'éliminer les vecteurs sans insertion. L'ADN a été transformé en bactéries DH5 α et les clones obtenus ont été criblés par digestion *PstI* et *BamHI*.

Il est nécessaire de garder la pression sélective chez les cellules transfectées avec une protéine pro-apoptotique pour éviter que les cellules perdent l'expression de cette protéine. Le vecteur pDisplay possède le gène de résistance au G-418 et le coût de cette drogue rendrait la production à grande échelle difficile. Le vecteur SR α puro possède le gène de résistance à la puromycine et le promoteur fort SR α [123]. D'autre part, des résultats obtenus au laboratoire ont démontré que le promoteur CMV était nettement plus fort que SR α chez les cellules HEK-293. Un vecteur SR α puro dont le

promoteur $SR\alpha$ avait été éliminé par délétion intra-moléculaire ($SR\alpha$ puro Δ) a donc été utilisé pour générer un système d'expression optimal. Les chimères scFv-FasL ont été digérées avec *SpeI* dont le site est située immédiatement avant le promoteur CMV présent dans pDisplay. Les extrémités ont été polies et une digestion *BamHI* a permis d'obtenir un fragment d'ADN incluant le promoteur CMV et les chimères scFv-FasL. Ces fragments ont été purifiés sur gel d'agarose puis ligués à $SR\alpha$ puro Δ digéré avec *SmaI* et *BamHI*. Une digestion *XbaI* a été effectuée post-ligation pour éliminer le $SR\alpha$ puro Δ parental puis l'ADN a été transformé en bactéries DH5 α . Les colonies obtenues ont été criblées avec *PstI* et chacune des chimères ont été amplifiées pour transfecter des cellules HEK-293.

3.10 Génération de cellules résistantes à l'apoptose

Les cellules HEK-293 ont été choisies pour produire les chimères scFv-FasL car elles sont relativement réfractaires à l'apoptose médiée par FasL, même si elles expriment le récepteur Fas [30; 54; 115]. Il a cependant été impossible d'obtenir des transfectants stables exprimant les chimères scFv-FasL car les cellules mouraient. L'adaptateur FADD est essentiel pour induire le recrutement et l'activation de la pro-caspase-8 suite à l'engagement du récepteur Fas par son ligand [58]. FADD est composé d'un domaine DD qui interagit avec Fas et d'un domaine DED qui interagit avec la pro-caspase-8 [58]. L'introduction d'une forme de FADD dépourvue de son domaine DED peut bloquer l'apoptose induite par FasL en compétitionnant avec le FADD endogène et ainsi agir comme un dominant négatif [24]. Il a donc été décidé d'introduire une forme dominante négative de FADD (FADDdn) dans les cellules HEK-293 afin de permettre la production des chimères scFv-FasL. Des cellules HeLa ont été traitées aux UV pendant 30 secondes pour induire l'expression de FADD [63] et après 16 heures de culture, de l'ADNc a été synthétisé. Un PCR a été effectué avec les amorces 28 et 29 (l'amorce 29 introduisait un codon de terminaison en phase entre les domaines DD et DED de FADD) et le produit a été cloné dans pCR4Blunt-TOPO. Un clone recombinant a été identifié par digestion avec *EcoRI* et séquencé avec les amorces M13 reverse et M13 universel. Le FADDdn a été excisé de pCR4Blunt-TOPO par digestion avec *SpeI* et *BamHI*, purifié sur gel d'agarose et introduit dans le vecteur $SR\alpha$ hygro digéré par ces enzymes. Une digestion avec *PvuII* a été effectuée post-ligation et l'ADN a été transformé en bactéries XL1-Blue. Les clones obtenus ont été criblés avec *EcoRI* et *BamHI* et un clone positif a été amplifié pour la

transfection de cellules HEK-293.

Les cellules HEK-293 ont été transfectées par électroporation avec SR α hygro-FADDdn et une population de transfectants stables a été obtenue par sélection à l'hygromycine B. Afin de sélectionner des transfectants hautement résistants à l'apoptose médiée par FasL, une portion de la population obtenue a été soumise à un traitement avec du FasL recombinant pour éliminer les cellules les plus sensibles à l'apoptose. La Figure 28 montre le niveau d'expression de FADD chez les cellules HEK-293 par analyse RT-PCR avec les amorces 28 et 29. La quantité d'ADNc a été normalisée avec un PCR spécifique à l'actine (amorces 43 et 44). La faible bande détectée chez les cellules non-transfectées correspond au FADD endogène des cellules HEK-293. Il est apparent que la population transfectée exprime un niveau de FADDdn beaucoup plus élevé que de FADD endogène et que la sélection *in vitro* avec le FasL recombinant a mener à une augmentation non-négligeable du niveau d'expression de FADDdn. La population de cellules HEK-293 exprimant le FADDdn et ayant été sélectionnée *in vitro* a été utilisée pour exprimer les chimères scFv-FasL.

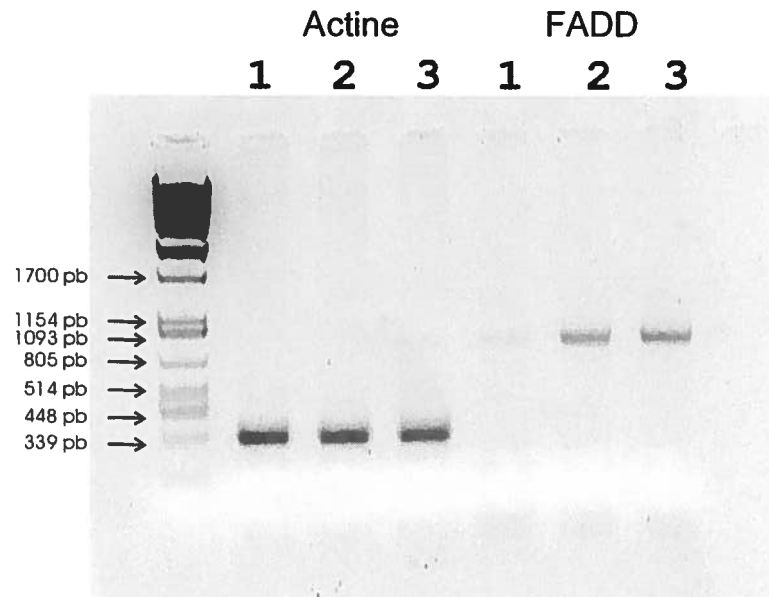


Figure 28. Analyse par RT-PCR de l'expression de FADDdn

1. HEK-293; 2. HEK-293/FADDdn; 3. HEK-293/FADDdn sélectionnées FasL

Un RT-PCR a été effectué sur les cellules HEK 293 non-transfectées, transfectées avec FADDdn ainsi que celles transfectées avec FADDdn et sélectionnées avec FasL. Les cellules transfectées expriment un niveau de FADDdn très supérieur au niveau de FADD endogène détecté dans les cellules non-transfectées.

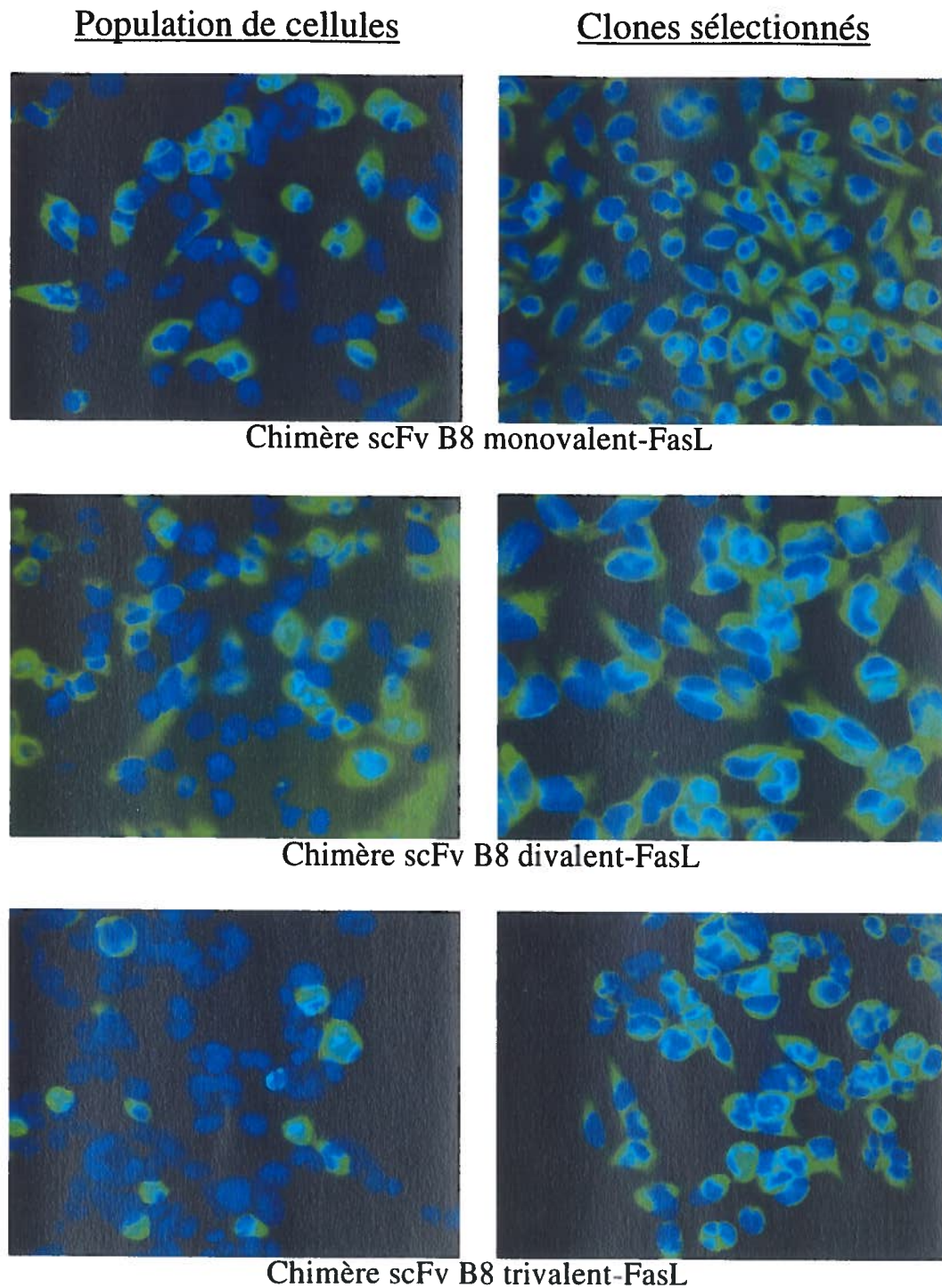


Figure 29. Analyse microscopique de l'expression des chimères scFv-FasL

Les cellules HEK 293 transfectées avec les chimères scFv-FasL ont été traitées avec la Brefeldine A avant d'être fixées et perméabilisées. Un anticorps reconnaissant la forme fonctionnelle de FasL a été utilisé pour évaluer l'expression de FasL (vert) tandis qu'une coloration au DAPI a permis la coloration des noyaux (bleu).

3.11 Expression des chimères scFv-FasL en cellules eucaryotes

Les différentes chimères scFv-FasL (monovalent, divalent et trivalent) ont été transfectées par électroporation dans les cellules HEK-293 exprimant FADDdn. L'expression des chimères scFv-FasL a été analysée par microscopie à fluorescence avec l'anticorps NOK-1 reconnaissant la forme fonctionnelle de FasL. Aucune détection de FasL n'a été possible sans bloquer le transport des protéines au niveau de l'appareil de Golgi avec la Brefeldine A, ce qui confirme la sécrétion des chimères. La Figure 29 montre l'expression des différentes chimères chez les populations obtenues suite à la sélection en puromycine, ainsi que chez des clones obtenus par dilution limite. La coloration au DAPI montre les noyaux en bleu et les chimères scFv-FasL en vert. La Figure 29 montre que parmi les populations de cellules puromycine-résistantes, plusieurs n'expriment pas les chimères scFv-FasL. La coloration nucléaire démontre que plusieurs cellules sont apoptotiques, particulièrement dans le cas de la chimère scFv trivalent. Chez les cellules démontrant une forte expression de FasL, des noyaux fragmentés sont apparents. Les clones obtenus par dilution limite expriment des niveaux intermédiaires de FasL par rapport à la population initiale, ce qui suggère que les cellules ayant une forte expression ont été éliminées par apoptose lors du clonage.

3.12 Génération de FasL recombinant trimérique

Outre l'utilisation de scFv divalent ou trivalent pour induire l'oligomérisation de FasL, il est possible d'utiliser un domaine d'oligomérisation protéique. Les domaines Leucine Zipper présents dans des facteurs de transcription comme Fos et Jun permettent leur dimérisation [74]. Ceux-ci sont ainsi nommés, par la présence de Leucines à toutes les sept positions qui induisent la formation de deux hélices alpha parallèles. Le remplacement de ces Leucines par des Isoleucines permet la formation de trois hélices alpha parallèles [43], les Isoleucines naturellement présentes dans le motif Leucine Zipper contribuant aussi à la trimérisation. La Figure 30 montre la structure du Leucine Zipper (Leucines en jaune) et de l'Isoleucine Zipper (Isoleucines en jaune). Les structures de ces deux motifs (Numéro d'accèsion PDB: 1ZIK et 1GCM) ont été modélisées avec le logiciel VMD version 1.7.1b (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>) et représentées graphiquement avec le logiciel POV-ray for Windows version 3.5 (<http://www.povray.org/>).

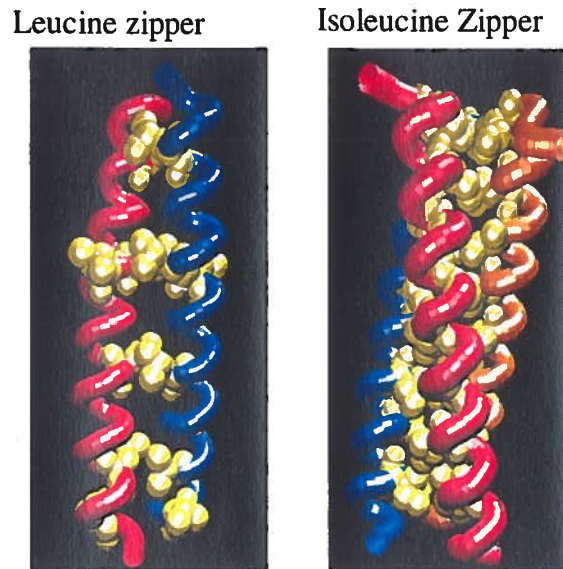


Figure 30. Structure du Leucine Zipper et de l'Isoleucine Zipper

Par sa structure, le domaine Leucine Zipper est un domaine de dimérisation qui forme deux hélices α parallèles grâce à la juxtaposition des leucines (jaunes) situées à toutes les sept positions. Le remplacement de ces leucines par des isoleucines permet la formation de trois hélices α parallèles et une trimérisation.

Un motif Isoleucine Zipper (IZ) permettant la trimérisation de FasL a été introduit entre le scFv monovalent et la portion extracellulaire de FasL. Des oligonucléotides complémentaires ont été utilisés afin d'introduire ce domaine de trimérisation. Ces oligonucléotides permettaient l'incorporation du motif IZ et d'une étiquette poly-histidine pour faciliter la purification. Les oligonucléotides 20 et 21 ont été hybridés ensemble et phosphorylés avant d'être ligués aux oligonucléotides 22 et 23 préalablement hybridés et phosphorylés. Le produit de ligation a été digéré avec *AgeI* pour éliminer les multimères et les monomères obtenus ont été ligués au site *BspEI* (compatible à *AgeI*) situé entre le scFv et FasL. Le produit de ligation a été transformé en bactéries Top 10 et les clones recombinants ont été identifiés par digestion avec *BglII* et *BamHI*, puis séquencés avec l'amorce B8 seqzipper.

H H H H H H R M K Q I E D Q I E E I L S K
 CCGGTCATCACCACCATCACCATCGGATGAAGCAGATCGAGGACAAGATCGAGGAGATCTTGTCCAAG
 AGTAGTGGTGGTAGTGGTAGCCTACTTCGCTAGCTCCTGTTCTAGCTCCTCTAGAACAGGTTCTAAATGGGTAG

 I Y H I E E D I A R I K K L I G E R L L
 ATTTACCACATCGAGAACGAGATCGCCCGGATCAAGAAGCTGATCGGGCAGCGGCTGCTCA
 CTCTTGCTCTAGCGGGCCTAGTTCTTCGACTAGCCGCTCGCCGACGAGTGCC

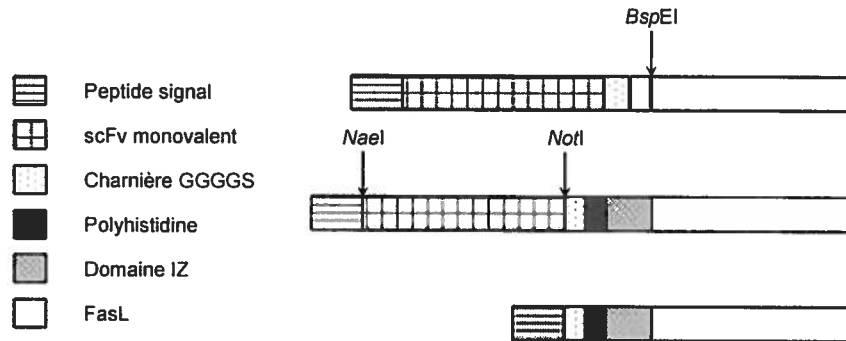


Figure 31. Introduction d'un domaine Isoleucine Zipper

Le motif d'Isoleucine Zipper a été inséré entre le scFv monovalent et la portion extracellulaire de FasL par le clonage d'oligonucléotides complémentaires dans le site BspEI. Afin de produire du FasL trivalent, le scFv a été éliminé par délétion intramoléculeuse grâce à une digestion avec les enzymes de restrictions *NaeI* et *NotI*

Afin d'évaluer l'efficacité de la trimérisation induite par le domaine IZ, du FasL recombinant trimérique a été généré. Le scFv a été éliminé de la construction scFv-IZ-FasL par délétion intra-moléculaire avec une digestion *NaeI* et *NotI*. Ceci permettait d'éliminer le scFv tout en gardant le peptide signal en phase avec IZ-FasL. Les extrémités ont été polies, l'ADN purifié sur gel d'agarose, le vecteur ligué sur lui-même et le produit de ligation transformé en bactéries DH5 α . Les clones positifs ont été identifiés par digestion *PstI* et séquencés avec l'amorce T7 pour confirmer que le cadre de lecture avait été préservé. Une délétion identique a été effectuée sur la chimère scFv-FasL sans domaine IZ. Les constructions FasL et IZ-FasL ont été introduites par électroporation dans les HEK-293 exprimant le FADDdn. Suivant la sélection avec de la puromycine, des clones ont été obtenus par dilution limite. Ces clones ont été traités avec la Brefeldin A et l'expression de FasL a été vérifiée par microscopie selon la méthode déjà décrite pour la détection des chimères scFv-FasL. La génération des constructions FasL et IZ-FasL permettra de vérifier la fonctionnalité du domaine isoleucine zipper et d'évaluer l'efficacité de trimérisation de ce domaine.

4. DISCUSSION

4.1 Sélection d'un anticorps et génération d'un scFv

La protection d'allogreffes par des molécules constituées de la fusion de scFv et de la portion extracellulaire de FasL impliquait la création de scFv spécifique aux organes greffés. Comme les CMH I diffèrent d'un individu à l'autre, ces molécules constituaient une cible idéale permettant de fixer spécifiquement les chimères pro-apoptotiques aux organes greffés sans risque d'interaction avec les cellules de l'hôte. L'anticorps B8-24-3 a été sélectionné afin de générer un scFv dérivé de cet anticorps. Cet anticorps reconnaît les haplotypes b et p des CMH I murins, ce qui correspond aux CMH I des souris donneuses du modèle murin de rejet d'allogreffe: les souris donneuses expriment les CMH I D^p, D^b, K^p ou K^b tandis que les souris receveuses expriment D^k ou K^k. La spécificité de l'anticorps B8-24-3 a préalablement été vérifiée grâce à des cellules HeLa exprimant les différents CMH I (D^p, D^b, D^k, K^p, K^b et K^k). L'anticorps B8-24-3 a été produit à partir de l'hybridome et la reconnaissance de cet anticorps a été évaluée par cytométrie en utilisant les cellules HeLa exprimant les différents CMH I. Ainsi, il a été possible de déterminer que cet anticorps était spécifique pour les haplotypes b et p, avec une reconnaissance des allèles D^p, K^p et K^b (figure 11). Un scFv a été construit à partir de cet l'hybridome.

Au départ, le projet consistait à produire des scFv dérivés de l'anticorps B8-24-3 et d'augmenter l'affinité de cet anticorps par mutagenèse aléatoire et/ou dirigée pour ainsi obtenir des scFvs de haute affinité. L'affinité élevée des scFvs est essentielle afin de maximiser la présence des chimères à la greffe et éviter des problèmes d'hépatotoxicité pouvant subvenir suite à l'interaction de FasL avec son récepteur Fas qui est fortement exprimé au niveau des hépatocytes [95; 130]. Ainsi, la mutagenèse aurait été effectuée puis les scFvs auraient été sélectionnés pour ceux présentant une haute affinité par des techniques d'expression en phages. En effet, il est possible de facilement sélectionner un scFv de haute affinité via l'utilisation de phage exprimant les scFvs en fusion avec la protéine de surface III du phage. Les scFvs ont donc été clonés dans un phagemide (pCANTAB) permettant l'expression de scFvs solubles lors de l'utilisation d'une souche bactérienne non-suppressive ou de scFv fusionnés à la protéine III du phage lors de l'utilisation d'une souche bactérienne suppressive. Suivant l'assemblage et le clonage d'un scFv dérivé de l'anticorps B8-24-3 dans le

vecteur pCR4Blunt-TOPO, les scFvs ont été clonés dans le vecteur pCANTAB. Le clonage dans ce vecteur a permis de démontrer la toxicité associée à la production de scFv en bactéries. Ainsi, les clonages effectués avec les bactéries DH5 α ont généré que des scFvs non-fonctionnels ayant des bases délétées ou encore des mutations ponctuelles introduisant un codon de terminaison. La production de scFv dans le vecteur pCANTAB est sous le contrôle du promoteur *lac*, un promoteur dit fuyant, qui même en absence d'inducteur permet une production assez élevée de protéine. Il a été supposé que ce taux basale de scFv était suffisant pour induire la mort des bactéries de façon similaire aux études ayant déjà démontré que la production de scFv pouvait être toxique pour les bactéries [121]. En effet, le répresseur codé par le gène *lacI^q* permet en partie la répression du promoteur *lac*, mais la transcription peut tout de même être initiée. De plus, l'ajout de glucose dans le milieu environnant permet d'activer la répression catabolique et d'éliminer le taux basal de protéine [53]. La souche bactérienne utilisée initialement pour les clonages, soit les DH5 α ne possédait pas le répresseur et de plus il n'y avait pas de glucose dans le milieu de culture utilisée lors des clonages, ce qui permettait la production des scFvs et ce même sans la présence d'inducteur. Une nouvelle souche bactérienne possédant le répresseur *lacI^q* (XL1-Blue) a donc été utilisée, ainsi qu'une concentration de 20 mM en glucose dans le milieu de culture. Ces nouvelles conditions ont complètement éliminé la production basale de scFv et il a été possible de cloner un scFv dans le vecteur pCANTAB. La réussite du clonage seulement lors de l'inhibition complète de l'expression des scFvs confirmait ainsi la toxicité bactérienne associée à la production de scFv.

L'augmentation de l'affinité par un processus de mutagenèse suivit d'une sélection via l'expression en phage est un processus long et laborieux. Une alternative secondaire, soit l'augmentation de la valence d'un scFv, peut permettre par un procédé plus simple d'augmenter l'avidité d'un scFv envers son antigène. L'augmentation de la valence d'un scFv consiste à forcer l'association d'un scFv en dimère, trimère ou tétramère. De plus, comme FasL doit être oligomérisés pour induire l'apoptose, l'utilisation de scFv divalent ou trivalent était essentielle. Des scFvs divalents et trivalents ont donc été générés en utilisant une charnière plus courte. L'utilisation d'une charnière plus courte pour relier la chaîne lourde et la chaîne légère empêche le repliement du scFv et l'association des domaines variables. Deux ou trois scFvs doivent ainsi s'associer pour permettre l'assemblage des deux

domaines. Les différents scFvs (monovalent, divalent et trivalent) ont été générés et produits de manière soluble en bactéries puis ont été purifiés sur colonne de Ni-NTA. Bien que la dimérisation ou la trimérisation des scFvs n'a pas été confirmée, les charnières utilisées ont été basées sur celle utilisée dans la littérature par d'autres groupes et qui permettaient d'obtenir des scFvs divalents (Gly₆Ser) ou trivalents (Gly). La valence des scFvs pourrait être confirmée par tamis moléculaire. Des tests préliminaires effectués avec les scFvs solubles produits en bactéries semblaient démontrer la reconnaissance du scFv envers les CMH I. Cependant, le faible rendement obtenu a limité les tests effectués et ces résultats doivent être confirmés. La fonctionnalité du scFv sera vérifiée en utilisant les cellules HeLa exprimant les différents CMH I. Néanmoins, tous les outils nécessaires ont été développés afin, le cas échéant, de procéder à de la mutagenèse sur les scFvs suivit d'une expression en phage pour sélectionner un scFv spécifique au CMH I D^p, K^p et K^b.

4.2 Optimisation du système de production de scFvs

L'analyse des différentes fractions lors de la production de scFv soluble dans le vecteur pCANTAB a permis de détecter des scFvs dans les corps d'inclusions et dans l'espace périplasmique des bactéries (figure 18). Il y avait présence de scFv dans le surnageant seulement lors d'une incubation prolongée (16 à 18 heures) des cultures bactériennes. La présence de ces scFvs dans le surnageant a été associée à la lyse des bactéries, ce qui confirmait la toxicité induite par la production de scFv. Il a été supposé que les scFvs se sont accumulés dans des corps d'inclusions suite à la présence d'un mauvais codon d'initiation (figure 24), ce qui affectait la reconnaissance adéquate du signal peptide dans le vecteur pCANTAB. Cette accumulation de scFv intracellulaire devait être toxique pour les bactéries et menait à la perte du plasmide ou à la sélection des scFvs mutés qui formaient des protéines non-fonctionnelles.

Un nouveau vecteur, dérivé du vecteur pLEX, a été généré afin de permettre l'expression des scFvs avec un peptide signal adéquat. L'utilisation de ce nouveau vecteur a augmenté la production de scFv dans le périplasme par rapport au vecteur pCANTAB (figure 25). La présence d'un signal peptide optimal a assurément permis une meilleure sécrétion des scFvs. De plus, le promoteur λ du vecteur pLEX est un promoteur fort permettant un niveau d'expression très élevé. Contrairement au

promoteur *lac*, ce promoteur est finement régulé et il n'y a aucune expression de protéines en absence d'inducteur. Le vecteur pLEX est donc un vecteur plus adapté pour une production élevée dans une courte période tel lors de la production de protéine toxique comme les scFvs dérivés de l'anticorps B8-24-3. Malgré l'utilisation d'un vecteur approprié, le rendement obtenu avec le vecteur pLEX était nettement inférieur au rendement obtenu dans d'autres études [27; 129; 132]. Lors de l'ensemencement de 4 litres de milieu de culture, seulement 35 µg de scFv purifié ont été récoltés. L'expression de scFv en bactéries permet une production pouvant atteindre jusqu'à 1 g/l lors de l'utilisation de fermenteur. La production de scFv en flacon est moins productive, mais l'obtention d'un rendement variant entre 1-10 mg/ml est couramment obtenu. Le système d'expression et/ou les conditions utilisées pour la production du scFv dérivé de l'anticorps B8-24-3 ne semblent pas adéquats. Il est possible que le système d'exportation soit saturé, ce qui mènerait à l'accumulation des scFvs en corps d'inclusions. L'analyse par immunobuvardage de type Western des corps d'inclusions a permis de déterminer qu'il y avait présence de scFv, même lors de l'utilisation du vecteur pLEX au lieu du vecteur pCANTAB (résultats non-montrés). La quantité de scFv était moins importante avec le vecteur pLEX, mais afin d'augmenter le rendement périplasmique, une diminution des scFvs dans les corps d'inclusions serait importante. Pour ce faire, la diminution de la température lors de l'induction favoriserait la sécrétion des protéines dans le périplasma, car ceci ralentit la vitesse de production des scFvs par les bactéries et peut empêcher la saturation du système de sécrétion. L'ajout de certains sucres peut aussi améliorer le rendement des scFvs, mais l'utilisation de cette technique pour le scFv B8-24-3 n'a permis aucune différence significative.(résultats non-montrés) [66]. Diverses stratégies peuvent ainsi être employées afin de maximiser la production de scFv et ces stratégies pourraient améliorer le rendement en bactérie du scFv B8-24-3. Outre les bactéries, plusieurs autres systèmes d'expressions ont été employés pour la production de scFv: plantes, levures, cellules de mammifères, cellules d'insectes et translation *in vivo*. Il pourrait donc être intéressant de concevoir un autre système de production pour le scFv B8-24-3 étant donné que le rendement d'un scFv peut différer d'un système à l'autre.

4.3 Influence de la stabilité des scFvs sur leur rendement

Lors de la production des différents scFvs (monovalent, divalent et trivalent), il a été observé que le scFv monovalent avait toujours une production inférieure à celle des scFvs divalents et trivalents (résultats non-montrés). Étant donné que les différents scFvs dérivés de l'anticorps B8-24-3 ont été amplifiés avec des oligonucléotides dégénérés, la séquence en acide aminé à ces endroits pouvait différer. De plus, la séquence en acide aminé de cet anticorps étant inconnue, l'utilisation des oligonucléotides dégénérés assurait l'amplification des chaînes variables pour le clonage, mais ne permettait pas de conserver la séquence native de l'anticorps. La séquence en acides aminés située dans les régions correspondant aux oligonucléotides dégénérés ont été comparés pour chacun des scFvs (monovalent, divalent et trivalent) (figure 21). Il y avait effectivement certaines différences dans la composition en acide aminé et les séquences ont été comparées avec une base de donnée d'anticorps (<http://imgt.cines.fr>). Ceci a permis de déterminer que la chaîne lourde de l'anticorps B8-24-3 se rapprochait le plus d'une chaîne V14 et que la chaîne légère était une $\kappa 12$. De plus, parmi les trois scFvs, le scFv monovalent était celui présentant le plus de différence en acide aminé avec la séquence des chaînes variables V14 et $\kappa 12$. Il y avait sept différences d'acides aminés entre le scFv monovalent et la séquence correspondant aux chaînes V14 et $\kappa 12$ tandis que pour le scFv divalent et trivalent, il y avait respectivement trois et deux substitutions d'acides aminés. Les anticorps retrouvés naturellement chez les souris tout comme ceux retrouvés chez les humains, résultent d'un processus complexe de maturation et de sélection permettant de générer des anticorps fonctionnels ayant un repliement adéquat pour ainsi assurer une bonne stabilité. Le scFv monovalent ayant le plus de différence dans sa composition en acide aminé avec un anticorps naturellement retrouvé chez les souris, il a été supposé que le manque de stabilité était responsable du rendement inférieur observé. Par mutagenèse par PCR, les scFvs monovalents, divalents et trivalents ont été corrigés afin d'obtenir une composition en acide aminé identique à celle correspondant à la chaîne lourde V14 et à la chaîne légère $\kappa 12$. Par la suite, une production de scFv a été effectuée avec le scFv monovalent original et celui ayant eu les mutations. Une grande différence a été observée dans le rendement avec un rendement nettement supérieur pour le scFv ayant eu les mutations. Il a été supposé que les mutations apportées au scFv monovalent ont stabilisées le scFv, ce qui a

permis d'augmenter le rendement lors de la production de scFv soluble. Étant donné que le scFv monovalent présentait le plus de divergence dans sa composition en acide aminé, les mutations apportées ont eu un impact majeur sur le scFv monovalent comparativement à l'impact apporté sur les scFvs divalents et trivalents.

Les paramètres influant sur la stabilité des anticorps et particulièrement sur celle d'un scFv sont nombreux [134]. Une bonne stabilité lors de la production d'un anticorps ou d'un scFv est importante afin d'éviter leur dénaturation et leur précipitation. De plus, un scFv plus stable résistera plus longtemps à une température de 37°C et aux protéases sériques, ce qui est important lors d'une utilisation thérapeutique. Les domaines variables des chaînes lourdes et légères interagissent étroitement ensemble et la présence des domaines constants dans un anticorps natif ou dans les fragments Fab permet une stabilisation des domaines variables. Cependant, lors de la génération d'un scFv, l'absence des domaines constants peut induire une instabilité et un éloignement des domaines variables qui peut être compensé en grande partie par la charnière utilisée. Un pont disulfure utilisé en complémentarité avec la charnière augmente l'interaction et la stabilité des domaines variables. Malgré tout, certains scFvs demeurent instables et le seul recours possible est d'introduire les CDRs du scFv désiré dans un scFv stable. Il est donc plus facile de muter, au niveau du squelette, des acides aminés reconnus pour leur importance dans la stabilité des scFvs. Ces acides aminés ont été identifiés en comparant la séquence d'anticorps naturel ayant suivi un processus de sélection et de maturation. Les acides aminés retrouvés avec une fréquence élevée aux mêmes positions ont ainsi été analysés plus en détail pour leur fonction dans la bonne conformation des anticorps. Parmi ces acides aminés importants, il a été établi que les cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfures intra-domaines sont très importantes pour la stabilité intrinsèque de chacune des chaînes variables. Ces ponts disulfures sont formés par les cystéines présentes en positions 22 et 92 de la chaîne lourde et celles aux positions 23 et 88 de la chaîne légère. L'analyse de la séquence du scFv B8-24-3 illustre la présence de ces cystéines à ces positions. Le scFv B8-24-3 possède donc un pont disulfure intradomaine stabilisant dans chacune de ces chaînes variables, ce qui appuie l'importance de l'expression des scFvs dans un milieu non-réducteur afin de favoriser la formation de ces ponts.

Les mutations apportées au scFv B8-24-3 ont permis d'augmenter le rendement en bactéries. Ces mutations rapprochaient le squelette du scFv d'une classe d'anticorps retrouvée chez les souris (V14 et κ 12). La mutation la plus importante effectuée pour le scFv monovalent est sans aucun doute le remplacement de l'acide glutamique par une glutamine à la position 6 de la chaîne lourde. Le scFv monovalent était le seul ayant un acide glutamique à cette position, comparativement aux scFvs divalents et trivalents qui avaient une glutamine et le rendement du monovalent était beaucoup plus faible. Au niveau des anticorps murins, seulement deux acides aminés différents sont retrouvés à la position 6 de la chaîne lourde, soit une glutamine ou une acide glutamique. Cependant, l'acide aminé présent a un impact majeur sur la stabilité des anticorps, car cet acide aminé interagit étroitement avec ceux présents aux positions 7 et 9 [47; 57]. Les anticorps murins ont été divisés en quatre classes selon les acides aminés retrouvés à ces trois positions [47; 57].

Classe	Acide aminé (Position 6,7,9)
I	E, S, P
II	E, S, G
III	Q, S, A
IV	Q, P, A

La combinaison du scFv monovalent (E, S, A) n'est pas retrouvée chez les anticorps naturels tandis que les scFvs divalents et trivalents ont une combinaison appartenant à la classe III (Q, S, A). Les oligonucléotides dégénérés utilisés lors de l'amplification par PCR ont incorporés un acide glutamique au lieu d'une glutamine et il est probable que cet acide aminé soit responsable du rendement inférieur observé chez le scFv monovalent. L'incorporation d'un acide glutamique au lieu d'une glutamine en position 6 de la chaîne lourde lors de la génération de scFv avec des oligonucléotides dégénérés a maintes fois été répertorié. Par la suite, le rétablissement du bon acide aminé (glutamine) stabilisait les scFvs et augmentait jusqu'à 30 fois la production de scFv soluble [67; 75]. Il semblerait que la charge négative induite par un acide glutamique à cette position aurait un effet déstabilisant comparativement à la charge neutre de la glutamine.

La stabilité du scFv B8-24-3 pourrait probablement être augmentée en mutant d'autres acides aminés clés. La comparaison de la séquence complète du scFv B8-24-

3 avec des séquences consensus des anticorps murins permettrait l'identification de résidus habituellement conservés dans le squelette, mais absent dans ce scFv. Une mutation intéressante qu'il serait possible d'apporter à la chaîne lourde du scFv B8-24-3 est la substitution de la lysine par une arginine à la position 66. Ces deux acides aminés sont représentés selon une fréquence équivalente dans les anticorps murins, mais il a été démontré que chez certains scFvs, l'incorporation d'une arginine avait un effet stabilisant comparativement à une lysine [105; 133].

4.4 Construction de chimères scFv-FasL

Outre l'augmentation de l'avidité, la génération des scFvs divalents et trivalents pourrait permettre d'induire l'oligomérisation de FasL. La trimérisation de FasL est une étape essentielle pour induire le signal apoptotique via le récepteur Fas et deux moyens ont été préconisés pour la production de FasL oligomériques: les scFvs divalents ou trivalents et l'utilisation d'un domaine d'isoleucine zipper. De plus, étant donné que les CMH I sont abondamment exprimés sur les cellules, la présence d'une quantité suffisante de chimère pourrait induire le rapprochement de FasL et son oligomérisation. Ainsi, les cellules exprimant les CMH I reconnus par les scFvs pourraient agir d'agent oligomérisant, ce qui ne nécessiterait pas la production de FasL oligomériques. Selon ce principe, les scFvs monovalents qui ne forcent pas la trimérisation de FasL pourraient être utilisés au même titre que ceux ayant le domaine isoleucine zipper. Il serait même plus avantageux d'utiliser ce type de scFv, car ces chimères en circulation seraient moins apoptotiques, donc moins toxiques.

Les différentes chimères scFv-FasL ont été générées et clonées dans un vecteur d'expression eucaryote puis transfectées dans des cellules HEK-293 rendues résistantes à l'apoptose médiée par FasL. Le vecteur utilisé possédait un peptide signal permettant la sécrétion des scFvs dans le milieu cellulaire. Le surnageant récolté a été déposé sur des cellules HEK-293 afin d'évaluer son pouvoir apoptotique. Il a ainsi été possible de déterminer que les chimères présentes dans le surnageant récolté induisaient l'apoptose des cellules HEK-293, mais aucune apoptose n'était observée sur des cellules HEK-293 exprimant le dominant négatif de FADD. Les chimères générées possèdent ainsi un pouvoir apoptotique. Cependant, afin de comparer le pouvoir apoptotique de chacune des chimères, il faudrait procéder à leur purification et à leur quantification, ce qui permettrait d'évaluer l'effet

d'oligomérisation apporté à FasL par les différents scFvs et le domaine d'isoleucine zipper. Le domaine Isoleucine zipper ayant déjà été utilisé pour trimériser CD40L, un membre de la famille de FasL, on peut supposer qu'il sera plus adéquat pour induire la trimérisation de FasL, car on ne sait pas si les scFvs dimériques et trimériques vont induire la conformation optimale du trimère de FasL.

4.5 Induction d'immunoprivilège artificiel

Tous les outils nécessaires ont été développés afin de permettre le ciblage de molécules apoptotiques vers des allogreffes. Des cellules expriment les différentes chimères scFv-FasL qui pourront être purifiées par colonne d'affinité. Ces chimères seront d'abord testées *in vitro* grâce aux cellules HeLa générées qui expriment les différents CMH I correspondant à ceux du modèle murin de rejet d'allogreffe. Pour ce faire, les cellules HeLa exprimant les CMH I agiront comme plate-forme de présentation (greffe) dans lesquelles des chimères seront ajoutées suivit de cellules T. La spécificité des scFvs devrait permettre d'induire l'apoptose des cellules T seulement lors de l'utilisation de cellules HeLa exprimant les CMH I D^p, K^p ou K^b (souris donneuses) et n'avoir aucun effet lors de l'utilisation des cellules D^k et K^k (souris receveuse). La validation *in vitro* du modèle demeure à effectuer avant de procéder aux tests *in vivo* dans le modèle murin. Néanmoins, l'approche utilisée permettrait d'effectuer un traitement *ex vivo* de la greffe et il serait possible de procéder à des traitements supplémentaires après la greffe par injection des chimères. Éventuellement, l'immunomodulation de la greffe par les chimères prolongerait la survie de la greffe en induisant une délétion sélective de cellules T allo-réactives. La création de sites immunoprivilégiés artificiels rendrait ainsi possible la greffe d'organe malgré une incompatibilité entre donneur et receveur. Cette approche est nettement plus applicable chez l'humain que les techniques de transgénèses utilisées auparavant tel l'utilisation d'adénovirus recombinants. La réponse immunitaire dirigée contre l'adénovirus ne permet pas l'utilisation de cette technique chez l'humain. De plus, l'expression de FasL doit être contrôlée afin d'éviter d'induire l'apoptose dans la greffe et l'utilisation d'adénovirus ne permet pas de réguler l'expression alors que l'utilisation d'une protéine soluble demeure parfaitement contrôlable.

Le problème majeur du modèle proposé est le risque d'induire l'apoptose au sein de la greffe. Même si les cellules T activées sont plus sensibles à l'apoptose, la présence de FasL oligomérisé à la surface des greffons pourrait induire l'apoptose des cellules avoisinantes comme il a été démontré dans d'autres modèles [111]. Ainsi, la décoration de greffe avec les chimères composées de scFvs spécifiques et du domaine extracellulaire de FasL pourrait mener à la destruction de la greffe contrairement au but visé. Ces molécules de ciblage prendraient ainsi une nouvelle utilité et pourraient être utilisées dans un contexte de thérapie anti-cancéreuse. Le scFv devrait alors être spécifique à un antigène tumoral, ce qui induirait l'oligomérisation de FasL à la surface des cellules cancéreuses et leur destruction.

5. CONCLUSION

Les travaux effectués ont permis la génération de tous les outils nécessaires pour la création de sites immunoprivilégiés artificiels. Une cible, soit les CMH I, a été identifiée pour fixer la portion extracellulaire de FasL aux greffes. Un anticorps spécifique aux CMH I des souris donneuses d'un modèle de rejet d'allogreffe a été identifié et un scFv a été généré à partir de cet anticorps. Le clonage de ce scFv dans le vecteur pCANTAB a démontré que l'expression de scFv était toxique pour les bactéries et que l'utilisation d'une souche bactérienne permettant l'inhibition complète de l'expression de scFv était essentielle pour éviter la mort des bactéries. Des analyses plus approfondies du vecteur pCANTAB ont démontré que l'absence d'un signal peptide adéquat dans ce vecteur combiné à un promoteur fuyant étaient responsables de la toxicité observée, ce qui amenait une perte de plasmide par les bactéries et la formation de mutation dans les scFvs. Un second vecteur, le vecteur pLEX s'est montré plus adéquat que le vecteur pCANTAB pour la sécrétion de scFv soluble dans le périplasma bactérien. Malgré l'utilisation du vecteur pLEX ayant un promoteur fort et un signal peptide adéquat, la production en bactéries du scFv B8-24-3 ne permet pas l'obtention d'un bon rendement. L'expression au niveau du périplasma de ce scFv ne semble pas pleinement optimisée et la renaturation des corps d'inclusions ou l'utilisation d'un nouveau système d'expression devrait être considéré.

La stabilité du scFv B8-24-3 a été améliorée en effectuant quelques mutations clés dans le squelette du scFv et l'amélioration de cette stabilité a permis un meilleur rendement lors de la production des scFvs. Les mutations effectuées ont été établies en comparant la séquence en acide aminé du scFv à celle d'anticorps naturels retrouvés chez la souris. La production d'un anticorps par les lymphocytes B suit un processus de maturation et de sélection qui génère des scFvs stables et aptes à résister aux conditions retrouvées dans le corps humains. La production d'anticorps à des fins thérapeutiques nécessite l'utilisation d'anticorps stables, résistants et adaptés aux conditions du corps humains. La stabilité d'un scFv devient ainsi un élément critique pouvant empêcher une application thérapeutique. La comparaison d'un scFv avec les séquences consensus retrouvées chez les anticorps naturels constitue un moyen efficace d'identifier les acides aminés susceptibles d'améliorer la stabilité d'un scFv. Le

clonage des chaînes variables d'un anticorps implique souvent l'utilisation d'oligonucléotides dégénérés lors de l'amplification par PCR. Ces oligonucléotides peuvent introduire un mauvais acide aminé et déstabiliser l'anticorps. Il devient alors important de comparer la séquence en acide aminé obtenue avec celles des anticorps naturels, car la substitution d'un acide aminé important par un autre acide aminé peut déstabiliser la chaîne variable comme ce fut le cas pour l'acide glutamique présent à la position 6 de la chaîne lourde du scFv monovalent B8-24-3.

Les molécules de ciblage constituées de chimère scFv B8-24-3 et de la portion extracellulaire de FasL ont été générées afin de permettre la création de sites immunoprivilégiés artificiels pour la protection de greffe. Cependant, la validation du mécanisme proposé doit être effectuée par une première série de tests *in vitro*. Ces tests permettront d'évaluer si la présence de faible dose de FasL induira une apoptose massive dans la greffe ou induira seulement l'apoptose de cellules beaucoup plus sensibles comme les cellules T activées. Selon les résultats obtenus, des tests *in vivo* pourront être effectués dans un modèle murin de rejet d'allogreffe. Ces molécules de ciblage pourraient être utilisées pour une thérapie du cancer si la présence de FasL induit une apoptose massive dans la greffe.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. ADAMS, G.P., J.E. MCCARTNEY, M.S. TAI, H. OPPERMAN, J.S. HUSTON, W.F. STAFFORD, 3RD, M.A. BOOKMAN, I. FAND, L.L. HOUSTON et L.M. WEINER. 1993. Highly specific in vivo tumor targeting by monovalent and divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv. Cancer Res, vol. 53. no. 17, p. 4026-4034.
2. ADAMS, G.P., R. SCHIER, A.M. MCCALL, R.S. CRAWFORD, E.J. WOLF, L.M. WEINER et J.D. MARKS. 1998. Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. Br J Cancer, vol. 77. no. 9, p. 1405-1412.
3. ALLISON, J., H.M. GEORGIU, A. STRASSER et D.L. VAUX. 1997. Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 94. no. 8, p. 3943-3947.
4. ASHKENAZI, A. et V.M. DIXIT. 1998. Death receptors: signaling and modulation. Science, vol. 281. no. 5381, p. 1305-1308.
5. ASKENASY, N., E.S. YOLCU, Z. WANG et H. SHIRWAN. 2003. Display of Fas ligand protein on cardiac vasculature as a novel means of regulating allograft rejection. Circulation, vol. 107. no. 11, p. 1525-1531.
6. BEI, R., J. SCHLOM et S.V. KASHMIRI. 1995. Baculovirus expression of a functional single-chain immunoglobulin and its IL-2 fusion protein. J Immunol Methods, vol. 186. no. 2, p. 245-255.
7. BELLGRAU, D., D. GOLD, H. SELAWRY, J. MOORE, A. FRANZUSOFF et R.C. DUKE. 1995. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. Nature, vol. 377. no. 6550, p. 630-632.
8. BENICHO, G. et E.V. FEDOSEYEVA. 1996. The contribution of peptides to T cell allorecognition and allograft rejection. Int Rev Immunol, vol. 13. no. 3, p. 231-243.
9. BERESFORD, G.W., G. PAVLINKOVA, B.J. BOOTH, S.K. BATRA et D. COLCHER. 1999. Binding characteristics and tumor targeting of a covalently linked divalent CC49 single-chain antibody. Int J Cancer, vol. 81. no. 6, p. 911-917.
10. BETTER, M., C.P. CHANG, R.R. ROBINSON et A.H. HORWITZ. 1988. Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. Science, vol. 240. no. 4855, p. 1041-1043.
11. 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.

12. BJORKMAN, P.J., M.A. SAPER, B. SAMRAOUI, W.S. BENNETT, J.L. STROMINGER et D.C. WILEY. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature, vol. 329. no. 6139, p. 512-518.
13. 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.
14. BOLDIN, M.P., T.M. GONCHAROV, Y.V. GOLTSEV et D. WALLACH. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell, vol. 85. no. 6, p. 803-815.
15. BOLDIN, M.P., E.E. VARFOLOMEEV, Z. PANCER, I.L. METT, J.H. CAMONIS et D. WALLACH. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J Biol Chem, vol. 270. no. 14, p. 7795-7798.
16. BOULIANNE, G.L., N. HOZUMI et M.J. SHULMAN. 1984. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. Nature, vol. 312. no. 5995, p. 643-646.
17. BRAUN, M.Y., A. MCCORMACK, G. WEBB et J.R. BATCHELOR. 1993. Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. Transplantation, vol. 55. no. 1, p. 177-182.
18. BRINKMANN, U., Y. REITER, S.H. JUNG, B. LEE et I. PASTAN. 1993. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 90. no. 16, p. 7538-7542.
19. BUCHEGGER, F., C.M. HASKELL, M. SCHREYER, B.R. SCAZZIGA, S. RANDIN, S. CARREL et J.P. MACH. 1983. Radiolabeled fragments of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen for localization of human colon carcinoma grafted into nude mice. J Exp Med, vol. 158. no. 2, p. 413-427.
20. BUCHNER, J., I. PASTAN et U. BRINKMANN. 1992. A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. Anal Biochem, vol. 205. no. 2, p. 263-270.
21. CARTER, P. 2001. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. Nat Rev Cancer, vol. 1. no. 2, p. 118-129.
22. CHINN, P.C., J.E. LEONARD, J. ROSENBERG, N. HANNA et D.R. ANDERSON. 1999. Preclinical evaluation of 90Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody for treatment of non-Hodgkin's lymphoma. Int J Oncol, vol. 15. no. 5, p. 1017-1025.

23. CHINNAIYAN, A.M., K. O'ROURKE, M. TEWARI et V.M. DIXIT. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell, vol. 81. no. 4, p. 505-512.
24. CHINNAIYAN, A.M., C.G. TEPPER, M.F. SELDIN, K. O'ROURKE, F.C. KISCHKEL, S. HELLBARDT, P.H. KRAMMER, M.E. PETER et V.M. DIXIT. 1996. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. J Biol Chem, vol. 271. no. 9, p. 4961-4965.
25. COSIMI, A.B., R.C. BURTON, R.B. COLVIN, G. GOLDSTEIN, F.L. DELMONICO, M.P. LAQUAGLIA, N. TOLKOFF-RUBIN, R.H. RUBIN, J.T. HERRIN et P.S. RUSSELL. 1981. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. Transplantation, vol. 32. no. 6, p. 535-539.
26. CUMBER, A.J., E.S. WARD, G. WINTER, G.D. PARNELL et E.J. WAWRZYNCZAK. 1992. Comparative stabilities in vitro and in vivo of a recombinant mouse antibody FvCys fragment and a bisFvCys conjugate. J Immunol, vol. 149. no. 1, p. 120-126.
27. DENTON, G., K. BRADY, B.K. LO, A. MURRAY, C.R. GRAVES, O.D. HUGHES, S.J. TENDLER, C.A. LAUGHTON et M.R. PRICE. 1999. Production and characterization of an anti-(MUC1 mucin) recombinant diabody. Cancer Immunol Immunother, vol. 48. no. 1, p. 29-38.
28. DORAI, H., J.E. MCCARTNEY, R.M. HUDZIAK, M.S. TAI, A.A. LAMINET, L.L. HOUSTON, J.S. HUSTON et H. OPPERMANN. 1994. Mammalian cell expression of single-chain Fv (sFv) antibody proteins and their C-terminal fusions with interleukin-2 and other effector domains. Biotechnology (N Y), vol. 12. no. 9, p. 890-897.
29. DUBEL, S., F. BREITLING, R. KONTERMANN, T. SCHMIDT, A. SKERRA et M. LITTLE. 1995. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). J Immunol Methods, vol. 178. no. 2, p. 201-209.
30. DULAT, H.J., C. VON GRUMBKOW, W. BAARS, N. SCHRODER, K. WONIGEIT et R. SCHWINZER. 2001. Down-regulation of human alloimmune responses by genetically engineered expression of CD95 ligand on stimulatory and target cells. Eur J Immunol, vol. 31. no. 7, p. 2217-2226.
31. EARNSHAW, W.C., L.M. MARTINS et S.H. KAUFMANN. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem, vol. 68. no., p. 383-424.
32. ELDIN, P., M.E. PAUZA, Y. HIEDA, G. LIN, M.P. MURTAUGH, P.R. PENTEL et C.A. PENNELL. 1997. High-level secretion of two antibody single chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. J Immunol Methods, vol. 201. no. 1, p. 67-75.

33. ELHALEL, M.D., J.H. HUANG, W. SCHMIDT, J. RACHMILEWITZ et M.L. TYKOCINSKI. 2003. CTLA-4. FasL induces alloantigen-specific hyporesponsiveness. J Immunol, vol. 170. no. 12, p. 5842-5850.
34. FISCHER, R., J. DROSSARD, N. EMANS, U. COMMANDEUR et S. HELLWIG. 1999. Towards molecular farming in the future: pichia pastoris-based production of single-chain antibody fragments. Biotechnol Appl Biochem, vol. 30 (Pt 2). no., p. 117-120.
35. FISHER, G.H., F.J. ROSENBERG, S.E. STRAUS, J.K. DALE, L.A. MIDDLETON, A.Y. LIN, W. STROBER, M.J. LENARDO et J.M. PUCK. 1995. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. Cell, vol. 81. no. 6, p. 935-946.
36. FISHWILD, D.M., S.L. O'DONNELL, T. BENGOCHEA, D.V. HUDSON, F. HARDING, S.L. BERNHARD, D. JONES, R.M. KAY, K.M. HIGGINS, S.R. SCHRAMM, *et al.* 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. Nat Biotechnol, vol. 14. no. 7, p. 845-851.
37. GAINER, A.L., W.L. SUAREZ-PINZON, W.P. MIN, J.R. SWISTON, C. HANCOCK-FRIESEN, G.S. KORBUTT, R.V. RAJOTTE, G.L. WARNOCK et J.F. ELLIOTT. 1998. Improved survival of biolistically transfected mouse islet allografts expressing CTLA4-Ig or soluble Fas ligand. Transplantation, vol. 66. no. 2, p. 194-199.
38. GALILI, U. 1993. Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. Immunol Today, vol. 14. no. 10, p. 480-482.
39. GLENNIE, M.J. et P.W. JOHNSON. 2000. Clinical trials of antibody therapy. Immunol Today, vol. 21. no. 8, p. 403-410.
40. GLENNIE, M.J., H.M. MCBRIDE, A.T. WORTH et G.T. STEVENSON. 1987. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. J Immunol, vol. 139. no. 7, p. 2367-2375.
41. GOEL, A., D. COLCHER, J.S. KOO, B.J. BOOTH, G. PAVLINKOVA et S.K. BATRA. 2000. Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. Biochim Biophys Acta, vol. 1523. no. 1, p. 13-20.
42. GRIFFITH, T.S., T. BRUNNER, S.M. FLETCHER, D.R. GREEN et T.A. FERGUSON. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. Science, vol. 270. no. 5239, p. 1189-1192.
43. HARBURY, P.B., P.S. KIM et T. ALBER. 1994. Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer. Nature, vol. 371. no. 6492, p. 80-83.

44. HAYRY, P., H. ISONIEMI, S. YILMAZ, A. MENNANDER, K. LEMSTROM, A. RAISANEN-SOKOLOWSKI, P. KOSKINEN, J. USTINOV, I. LAUTENSCHLAGER, E. TASKINEN, *et al.* 1993. Chronic allograft rejection. Immunol Rev, vol. 134. no., p. 33-81.
45. HOHLBAUM, A.M., M.S. GREGORY, S.T. JU et A. MARSHAK-ROTHSTEIN. 2001. Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages *in vivo* induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors. J Immunol, vol. 167. no. 11, p. 6217-6224.
46. HOLLIGER, P., T. PROSPERO et G. WINTER. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 90. no. 14, p. 6444-6448.
47. HONEGGER, A. et A. PLUCKTHUN. 2001. The influence of the buried glutamine or glutamate residue in position 6 on the structure of immunoglobulin variable domains. J Mol Biol, vol. 309. no. 3, p. 687-699.
48. HORWITZ, A.H., C.P. CHANG, M. BETTER, K.E. HELLSTROM et R.R. ROBINSON. 1988. Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 85. no. 22, p. 8678-8682.
49. HUMPHREYS, D.P., O.M. VETTERLEIN, A.P. CHAPMAN, D.J. KING, P. ANTONIW, A.J. SUITERS, D.G. REEKS, T.A. PARTON, L.M. KING, B.J. SMITH, *et al.* 1998. F(ab')₂ molecules made from *Escherichia coli* produced Fab' with hinge sequences conferring increased serum survival in an animal model. J Immunol Methods, vol. 217. no. 1-2, p. 1-10.
50. 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 al.* 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.
51. HUSTON, J.S., M. MUDGETT-HUNTER, M.S. TAI, J. MCCARTNEY, F. WARREN, E. HABER et H. OPPERMAN. 1991. Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. Methods Enzymol, vol. 203. no., p. 46-88.
52. ILIADES, P., A.A. KORTT et P.J. HUDSON. 1997. Triabodies: single chain Fv fragments without a linker form trivalent trimers. FEBS Lett, vol. 409. no. 3, p. 437-441.
53. ISHIZUKA, H., A. HANAMURA, T. KUNIMURA et H. AIBA. 1993. A lowered concentration of cAMP receptor protein caused by glucose is an important determinant for catabolite repression in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, vol. 10. no. 2, p. 341-350.
54. ITAI, T., M. TANAKA et S. NAGATA. 2001. Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form. Eur J Biochem, vol. 268. no. 7, p. 2074-2082.

55. JONES, P.T., P.H. DEAR, J. FOOTE, M.S. NEUBERGER et G. WINTER. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature, vol. 321. no. 6069, p. 522-525.
56. JOST, C.R., I. KURUCZ, C.M. JACOBUS, J.A. TITUS, A.J. GEORGE et D.M. SEGAL. 1994. Mammalian expression and secretion of functional single-chain Fv molecules. J Biol Chem, vol. 269. no. 42, p. 26267-26273.
57. JUNG, S., S. SPINELLI, B. SCHIMMELE, A. HONEGGER, L. PUGLIESE, C. CABBILLAU et A. PLUCKTHUN. 2001. The importance of framework residues H6, H7 and H10 in antibody heavy chains: experimental evidence for a new structural subclassification of antibody V(H) domains. J Mol Biol, vol. 309. no. 3, p. 701-716.
58. JUO, P., C.J. KUO, J. YUAN et J. BLENIS. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas- induced apoptotic cascade. Curr Biol, vol. 8. no. 18, p. 1001-1008.
59. KANG, S.M., D.B. SCHNEIDER, Z. LIN, D. HANAHAN, D.A. DICHEK, P.G. STOCK et S. BAEKKESKOV. 1997. Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. Nat Med, vol. 3. no. 7, p. 738-743.
60. KAYAGAKI, N., A. KAWASAKI, T. EBATA, H. OHMOTO, S. IKEDA, S. INOUE, K. YOSHINO, K. OKUMURA et H. YAGITA. 1995. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. J Exp Med, vol. 182. no. 6, p. 1777-1783.
61. KERMAN, R.H., C.G. OROSZ et M.L. LORBER. 1997. Clinical relevance of anti-HLA antibodies pre and post transplant. Am J Med Sci, vol. 313. no., p. 275-278.
62. KHAZAELI, M.B., R.M. CONRY et A.F. LOBUGLIO. 1994. Human immune response to monoclonal antibodies. J Immunother, vol. 15. no. 1, p. 42-52.
63. KIM, P.K., R. WELLER, Y. HUA et T.R. BILLIAR. 2003. Ultraviolet irradiation increases FADD protein in apoptotic human keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun, vol. 302. no. 2, p. 290-295.
64. KING, D.J., A. TURNER, A.P. FARNSWORTH, J.R. ADAIR, R.J. OWENS, R.B. PEDLEY, D. BALDOCK, K.A. PROUDFOOT, A.D. LAWSON, N.R. BEELEY, *et al.* 1994. Improved tumor targeting with chemically cross-linked recombinant antibody fragments. Cancer Res, vol. 54. no. 23, p. 6176-6185.
65. KIPRIYANOV, S.M., S. DUBEL, F. BREITLING, R.E. KONTERMANN et M. LITTLE. 1994. Recombinant single-chain Fv fragments carrying C-terminal cysteine residues: production of bivalent and biotinylated miniantibodies. Mol Immunol, vol. 31. no. 14, p. 1047-1058.
66. KIPRIYANOV, S.M., G. MOLDENHAUER et M. LITTLE. 1997. High level production of soluble single chain antibodies in small-scale Escherichia coli cultures. J Immunol Methods, vol. 200. no. 1-2, p. 69-77.

67. KIPRIYANOV, S.M., G. MOLDENHAUER, A.C. MARTIN, O.A. KUPRIYANOVA et M. LITTLE. 1997. Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity. Protein Eng, vol. 10. no. 4, p. 445-453.
68. KNOX, P.G., A.E. MILNER, N.K. GREEN, A.G. ELIOPOULOS et L.S. YOUNG. 2003. Inhibition of metalloproteinase cleavage enhances the cytotoxicity of Fas ligand. J Immunol, vol. 170. no. 2, p. 677-685.
69. KOHLER, G. et C. MILSTEIN. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, vol. 256. no. 5517, p. 495-497.
70. KOSTELNY, S.A., M.S. COLE et J.Y. TSO. 1992. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. J Immunol, vol. 148. no. 5, p. 1547-1553.
71. KRAMMER, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. Nature, vol. 407. no. 6805, p. 789-795.
72. KRIEGER, N.R., D.P. YIN et C.G. FATHMAN. 1996. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. J Exp Med, vol. 184. no. 5, p. 2013-2018.
73. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, vol. 227. no. 259, p. 680-685.
74. LANDSCHULZ, W.H., P.F. JOHNSON et S.L. MCKNIGHT. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. Science, vol. 240. no. 4860, p. 1759-1764.
75. LANGEDIJK, A.C., A. HONEGGER, J. MAAT, R.J. PLANTA, R.C. VAN SCHAIK et A. PLUCKTHUN. 1998. The nature of antibody heavy chain residue H6 strongly influences the stability of a VH domain lacking the disulfide bridge. J Mol Biol, vol. 283. no. 1, p. 95-110.
76. LAU, H.T., M. YU, A. FONTANA et C.J. STOECKERT, JR. 1996. Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. Science, vol. 273. no. 5271, p. 109-112.
77. LE GALL, F., S.M. KIPRIYANOV, G. MOLDENHAUER et M. LITTLE. 1999. Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding. FEBS Lett, vol. 453. no. 1-2, p. 164-168.
78. LI, X.K., T. OKUYAMA, A. TAMURA, S. ENOSAWA, Y. KANEDA, S. TAKAHARA, N. FUNASHIMA, M. YAMADA, H. AMEMIYA et S. SUZUKI. 1998. Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas ligand-expressing plasmid. Transplantation, vol. 66. no. 11, p. 1416-1423.
79. LYNCH, D.H., F. RAMSDELL et M.R. ALDERSON. 1995. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. Immunol Today, vol. 16. no. 12, p. 569-574.

80. MADDEN, D.R., J.C. GORGA, J.L. STROMINGER et D.C. WILEY. 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. Nature, vol. 353. no. 6342, p. 321-325.
81. MAHIOUZ, D.L., G. AICHINGER, D.O. HASKARD et A.J. GEORGE. 1998. Expression of recombinant anti-E-selectin single-chain Fv antibody fragments in stably transfected insect cell lines. J Immunol Methods, vol. 212. no. 2, p. 149-160.
82. MARIANI, S.M., B. MATIBA, C. BAUMLER et P.H. KRAMMER. 1995. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. Eur J Immunol, vol. 25. no. 8, p. 2303-2307.
83. MARTINEZ-LORENZO, M.J., A. ANEL, S. GAMEN, I. MONLE N, P. LASIERRA, L. LARRAD, A. PINEIRO, M.A. ALAVA et J. NAVAL. 1999. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. J Immunol, vol. 163. no. 3, p. 1274-1281.
84. MENDEZ, M.J., L.L. GREEN, J.R. CORVALAN, X.C. JIA, C.E. MAYNARD-CURRIE, X.D. YANG, M.L. GALLO, D.M. LOUIE, D.V. LEE, K.L. ERICKSON, *et al.* 1997. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. Nat Genet, vol. 15. no. 2, p. 146-156.
85. MILENIC, D.E., T. YOKOTA, D.R. FILPULA, M.A. FINKELMAN, S.W. DODD, J.F. WOOD, M. WHITLOW, P. SNOY et J. SCHLOM. 1991. Construction, binding properties, metabolism, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. Cancer Res, vol. 51. no. 23 Pt 1, p. 6363-6371.
86. MIN, W.P., R. GORCZYNSKI, X.Y. HUANG, M. KUSHIDA, P. KIM, M. OBATAKI, J. LEI, R.M. SURI et M.S. CATTRAL. 2000. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. J Immunol, vol. 164. no. 1, p. 161-167.
87. MIWA, K., M. ASANO, R. HORAI, Y. IWAKURA, S. NAGATA et T. SUDA. 1998. Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. Nat Med, vol. 4. no. 11, p. 1287-1292.
88. MORRISON, S.L., M.J. JOHNSON, L.A. HERZENBERG et V.T. OI. 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 81. no. 21, p. 6851-6855.
89. MUZIO, M., A.M. CHINNAIYAN, F.C. KISCHKEL, K. O'ROURKE, A. SHEVCHENKO, J. NI, C. SCAFFIDI, J.D. BRETZ, M. ZHANG, R. GENTZ, *et al.* 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. Cell, vol. 85. no. 6, p. 817-827.
90. NAGATA, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. Annu Rev Genet, vol. 33. no., p. 29-55.

91. NAGATA, S. et P. GOLSTEIN. 1995. The Fas death factor. Science, vol. 267. no. 5203, p. 1449-1456.
92. NAGATA, S. et T. SUDA. 1995. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. Immunol Today, vol. 16. no. 1, p. 39-43.
93. NICHOLLS, P.J., V.G. JOHNSON, S.M. ANDREW, H.R. HOOGENBOOM, J.C. RAUS et R.J. YOULE. 1993. Characterization of single-chain antibody (sFv)-toxin fusion proteins produced in vitro in rabbit reticulocyte lysate. J Biol Chem, vol. 268. no. 7, p. 5302-5308.
94. NISHIMURA, Y., A. ISHII, Y. KOBAYASHI, Y. YAMASAKI et S. YONEHARA. 1995. Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. J Immunol, vol. 154. no. 9, p. 4395-4403.
95. OGASAWARA, J., R. WATANABE-FUKUNAGA, M. ADACHI, A. MATSUZAWA, T. KASUGAI, Y. KITAMURA, N. ITOH, T. SUDA et S. NAGATA. 1993. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature, vol. 364. no. 6440, p. 806-809.
96. ORLINICK, J.R., K.B. ELKON et M.V. CHAO. 1997. Separate domains of the human Fas ligand dictate self-association and receptor binding. J Biol Chem, vol. 272. no. 51, p. 32221-32229.
97. ORUM, H., P.S. ANDERSEN, A. OSTER, L.K. JOHANSEN, E. RIISE, M. BJORNVAD, I. SVENDSEN et J. ENGBERG. 1993. Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage. Nucleic Acids Res, vol. 21. no. 19, p. 4491-4498.
98. OTTONELLO, L., G. TORTOLINA, M. AMELOTTI et F. DALLEGRI. 1999. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. J Immunol, vol. 162. no. 6, p. 3601-3606.
99. PACK, P., K. MULLER, R. ZAHN et A. PLUCKTHUN. 1995. Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in Escherichia coli. J Mol Biol, vol. 246. no. 1, p. 28-34.
100. PACK, P. et A. PLUCKTHUN. 1992. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in Escherichia coli. Biochemistry, vol. 31. no. 6, p. 1579-1584.
101. PARK, D.R., A.R. THOMSEN, C.W. FREVERT, U. PHAM, S.J. SKERRETT, P.A. KIENER et W.C. LILES. 2003. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. J Immunol, vol. 170. no. 12, p. 6209-6216.
102. PETER, M.E. et P.H. KRAMMER. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ, vol. 10. no. 1, p. 26-35.

103. PLUCKTHUN, A. et P. PACK. 1997. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. Immunotechnology, vol. 3. no. 2, p. 83-105.
104. POWELL, W.C., B. FINGLETON, C.L. WILSON, M. BOOTHBY et L.M. MATRISIAN. 1999. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. Curr Biol, vol. 9. no. 24, p. 1441-1447.
105. PROBA, K., A. WORN, A. HONEGGER et A. PLUCKTHUN. 1998. Antibody scFv fragments without disulfide bonds made by molecular evolution. J Mol Biol, vol. 275. no. 2, p. 245-253.
106. RENSING-EHL, A., K. FREI, R. FLURY, B. MATIBA, S.M. MARIANI, M. WELLER, P. AEBISCHER, P.H. KRAMMER et A. FONTANA. 1995. Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo. Eur J Immunol, vol. 25. no. 8, p. 2253-2258.
107. RHEINNECKER, M., C. HARDT, L.L. ILAG, P. KUFER, R. GRUBER, A. HOESS, A. LUPAS, C. ROTTENBERGER, A. PLUCKTHUN et P. PACK. 1996. Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. J Immunol, vol. 157. no. 7, p. 2989-2997.
108. RIEUX-LAUCAT, F., F. LE DEIST, C. HIVROZ, I.A. ROBERTS, K.M. DEBATIN, A. FISCHER et J.P. DE VILLARTAY. 1995. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. Science, vol. 268. no. 5215, p. 1347-1349.
109. RODRIGUES, M.L., B. SNEDECOR, C. CHEN, W.L. WONG, S. GARG, G.S. BLANK, D. MANEVAL et P. CARTER. 1993. Engineering Fab' fragments for efficient F(ab)2 formation in Escherichia coli and for improved in vivo stability. J Immunol, vol. 151. no. 12, p. 6954-6961.
110. ROSENBERG, A.S. et A. SINGER. 1992. Cellular basis of skin allograft rejection: an in vivo model of immune-mediated tissue destruction. Annu Rev Immunol, vol. 10. no., p. 333-358.
111. SAMEL, D., D. MULLER, J. GERSPACH, C. ASSOHOU-LUTY, G. SASS, G. TIEGS, K. PFIZENMAIER et H. WAJANT. 2003. Generation of a FasL-based proapoptotic fusion protein devoid of systemic toxicity due to cell-surface antigen-restricted Activation. J Biol Chem, vol. 278. no. 34, p. 32077-32082.
112. SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 74. no. 12, p. 5463-5467.
113. SAYEGH, M.H. et C.B. CARPENTER. 1996. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. Int Rev Immunol, vol. 13. no. 3, p. 221-229.

114. SAYEGH, M.H., B. WATSCHINGER et C.B. CARPENTER. 1994. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. Transplantation, vol. 57. no. 9, p. 1295-1302.
115. SCHNEIDER, P., J.L. BODMER, N. HOLLER, C. MATTMANN, P. SCUDERI, A. TERSKIKH, M.C. PEITSCH et J. TSCHOPP. 1997. Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. J Biol Chem, vol. 272. no. 30, p. 18827-18833.
116. SCHNEIDER, P., N. HOLLER, J.L. BODMER, M. HAHNE, K. FREI, A. FONTANA et J. TSCHOPP. 1998. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. J Exp Med, vol. 187. no. 8, p. 1205-1213.
117. SEINO, K., K. IWABUCHI, N. KAYAGAKI, R. MIYATA, I. NAGAOKA, A. MATSUZAWA, K. FUKAO, H. YAGITA et K. OKUMURA. 1998. Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. J Immunol, vol. 161. no. 9, p. 4484-4488.
118. SHUMAN, S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J Biol Chem, vol. 269. no. 51, p. 32678-32684.
119. SKERRA, A. et A. PLUCKTHUN. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. Science, vol. 240. no. 4855, p. 1038-1041.
120. SKERRA, A. et A. PLUCKTHUN. 1991. Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in Escherichia coli: influence of disulphides and cis-prolines. Protein Eng, vol. 4. no. 8, p. 971-979.
121. SOMERVILLE, J.E., JR., S.C. GOSHORN, H.P. FELL et R.P. DARVEAU. 1994. Bacterial aspects associated with the expression of a single-chain antibody fragment in Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol, vol. 42. no. 4, p. 595-603.
122. SWENSON, K.M., B. KE, T. WANG, J.S. MARKOWITZ, M.A. MAGGARD, G.S. SPEAR, D.K. IMAGAWA, J.A. GOSS, R.W. BUSUTTIL et P. SEU. 1998. Fas ligand gene transfer to renal allografts in rats: effects on allograft survival. Transplantation, vol. 65. no. 2, p. 155-160.
123. TAKEBE, Y., M. SEIKI, J. FUJISAWA, P. HOY, K. YOKOTA, 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.
124. TAKEUCHI, T., T. UEKI, H. NISHIMATSU, T. KAJIWARA, T. ISHIDA, K. JISHAGE, O. UEDA, H. SUZUKI, B. LI, N. MORIYAMA, *et al.* 1999. Accelerated rejection of Fas ligand-expressing heart grafts. J Immunol, vol. 162. no. 1, p. 518-522.

125. TANAKA, M., T. ITAI, M. ADACHI et S. NAGATA. 1998. Downregulation of Fas ligand by shedding. Nat Med, vol. 4. no. 1, p. 31-36.
126. TANAKA, M., T. SUDA, T. TAKAHASHI et S. NAGATA. 1995. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. Embo J, vol. 14. no. 6, p. 1129-1135.
127. TRAPANI, J.A., D.A. JANS et V.R. SUTTON. 1998. Lymphocyte granule-mediated cell death. Springer Semin Immunopathol, vol. 19. no. 3, p. 323-343.
128. VAN PARIJS, L. et A.K. ABBAS. 1996. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. Curr Opin Immunol, vol. 8. no. 3, p. 355-361.
129. VERMA, R., E. BOLETI et A.J. GEORGE. 1998. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. J Immunol Methods, vol. 216. no. 1-2, p. 165-181.
130. WATANABE-FUKUNAGA, R., C.I. BRANNAN, N. ITOH, S. YONEHARA, N.G. COPELAND, N.A. JENKINS et S. NAGATA. 1992. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. J Immunol, vol. 148. no. 4, p. 1274-1279.
131. WILBANKS, G.A. et J.W. STREILEIN. 1992. Fluids from immune privileged sites endow macrophages with the capacity to induce antigen-specific immune deviation via a mechanism involving transforming growth factor-beta. Eur J Immunol, vol. 22. no. 4, p. 1031-1036.
132. WONG, C., R. WAIBEL, M. SHEETS, J.P. MACH et R. FINNERN. 2001. Human scFv antibody fragments specific for the epithelial tumour marker MUC-1, selected by phage display on living cells. Cancer Immunol Immunother, vol. 50. no. 2, p. 93-101.
133. WORN, A. et A. PLUCKTHUN. 1998. Mutual stabilization of VL and VH in single-chain antibody fragments, investigated with mutants engineered for stability. Biochemistry, vol. 37. no. 38, p. 13120-13127.
134. WORN, A. et A. PLUCKTHUN. 2001. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. J Mol Biol, vol. 305. no. 5, p. 989-1010.
135. YOKOTA, T., D.E. MILENIC, M. WHITLOW et J. SCHLOM. 1992. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. Cancer Res, vol. 52. no. 12, p. 3402-3408.