

Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier

**PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE COMPLEXES
I-E^p/PEPTIDES STABLES**

Par
Marie-Pascale Gignac

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

Jury d'évaluation

Examineur externe	Mouhamed-Walid Mourad, Pavillon CHUL. Université Laval
Examineur interne	Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Claude Daniel, INRS-Institut Armand Frappier

SOMMAIRE

Notre laboratoire s'intéresse principalement à l'étude des mécanismes de rejet de greffe dépendant des voies d'alloréactivité directe et indirecte aux antigènes d'histocompatibilité de classe II. Le modèle murin que nous utilisons pour ces études est basé sur un clone de cellules T CD4+ (2.102), spécifiques pour le peptide Hb(64-76) lorsqu'il est présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^k. Ce clone de cellule T est de plus alloréactif contre la molécule du CMH de classe II I-E^p. Une première tentative d'identifier l'allopeptide naturel présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^p et reconnu par le récepteur de la cellule T 2.102 avait été effectuée à l'aide d'une approche biochimique qui permet la purification de l'allopeptide recherché. Les molécules I-E^p provenant de la lignée cellulaire CH27-E^p avaient été purifiées par chromatographie d'affinité et leurs peptides associés libérés et séparés par des traitements acides et par HPLC. Aucune fraction permettant de stimuler de la cellule T 2.102 n'avait été identifiée. Pourtant, cette même méthode avait permis d'identifier et de caractériser la forme naturelle du peptide Hb(64-76) présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^k. Le but de la présente étude était donc de purifier et de caractériser la molécule du CMH de classe II I-E^p stable par l'optimisation des protocoles de purification des molécules du CMH de classe II. Afin d'optimiser ces protocoles, une lignée cellulaire témoin a été utilisée puisqu'elle exprime constitutivement l'allomimotope EPM et qu'elle génère une forte activation de l'alloréactivité. De plus, la mise au point d'une immunoprécipitation suivie d'une immunoempreinte de type « Western » a permis de détecter des hétérodimères $\alpha\beta$ stables à l'aide d'un anticorps anti-chaîne α . Nos résultats démontrent que les complexes I-E^p/peptides ne sont pas stables dans les conditions standard d'élution de complexes du CMH de classe II. Néanmoins, nous avons identifié différents tampons d'élution permettant de détecter des complexes I-E^p et I-E^k/peptides stables. De plus, nous avons démontré que les complexes I-E^p/EPM purifiés stimulaient fortement l'hybridome T 2.102. La différence de stabilité entre les molécules du CMH de classe II I-E^p et I-E^k pourrait être expliquée par le fait que ces deux molécules ont une chaîne α identique alors que leur chaîne β diffère à 20 positions, toutes localisées sur le

domaine $\beta 1$. L'obtention de conditions de purification dans lesquelles I-E^P est stable, permettra éventuellement l'identification de l'allopeptide naturel présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P en utilisant une approche biochimique.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier sincèrement mon directeur de recherche, Dr. Claude Daniel, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

J'aimerais également exprimer ma gratitude envers tous les membres du laboratoire pour leur contribution scientifique à ce projet et pour l'atmosphère agréable qui fut instauré durant ces 3 années.

Finalement, j'aimerais tout particulièrement remercier mes parents et Jan-Yan pour tous les encouragements tout au long de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	I
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ANNEXES	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. HISTORIQUE	5
2. DEUX CLASSES DE MOLÉCULES DU CMH	6
2.1. Les molécules du CMH de classe I	6
2.2. Les molécules du CMH de classe II	7
3. STRUCTURE DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE I ET II	8
3.1. Structure des molécules du CMH de classe I	8
3.2. Structure des molécules du CMH de classe II	8
4. BIOSYNTHÈSE DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II	11
4.1. La chaîne invariante	11
4.2. Compartiments spéciaux	14
4.3. Le fragment CLIP	14
4.4. La molécule DM	15
4.5. Entrée des antigènes exogènes	16
5. LIAISON DU PEPTIDE À LA MOLÉCULE DU CMH DE CLASSE II	17
5.1. Réseau de liens hydrogènes	17
5.2. Liaison des domaines α 1 et β 1	18
5.3. Les différentes pochettes	18
6. STABILITÉ DES MOLÉCULES DU CMH DE		

CLASSE II	20
7. DIFFÉRENTES CONFORMATIONS DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II	21
8. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II	22
8.1. Caractérisation des séquences peptidiques	22
8.2. Conditions de purification	23
9. ALLORÉACTIVITÉ	24
10. UN MODÈLE D'ÉTUDE	26
APPROCHE EXPÉRIMENTALE	31
1. CELLULES	32
1.1. Lignées cellulaires	32
1.2. culture cellulaire	32
2. PRODUCTION ET PURIFICATION D'ANTICORPS	33
2.1. Production de surnageant d'anticorps	33
2.2. Purification des anticorps	33
2.3. Analyse par cytométrie en flux	34
2.4. Marquage à la biotine	34
3. PURIFICATION DE COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II	35
3.1. Préparation de l'immunoabsorbant	35
3.2. Solubilisation de l'antigène	35
3.3. Purification des complexes I-E ^k et I-E ^p	36
4. IMMUNOPRÉCIPITATIONS	36
4.1. Analyse de la stabilité des complexes du CMH de classe II	37
4.2. Optimisation de la méthode d'élution des complexes du CMH de classe II	37
5. TESTS DE STABILITÉ DES COMPLEXES	37
5.1. ELISA	37
5.2. Immunoempreinte ponctuelle	38
5.2.1. Méthode par capture d'antigènes	38

5.2.2. Méthode directe	39
5.3. Electrophorèse de protéine (SDS-PAGE)	39
5.3.1. Coloration des protéines	40
5.4. Immunoempreinte de type « Western »	40
6. PURIFICATION DE COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II À PARTIR DE SPLÉNOCYTES DE SOURIS	41
6.1. Récupération des cellules de la rates	41
7. TEST D'ACTIVATION D'HYBRIDOMES T	41
RÉSULTATS	43
1. CARACTÉRISATION DES ANTICORPS 14.4.4s, 17.3.3s ET 2B6.B8	44
2. DÉTERMINATION D'UNE MÉTHODE DE DÉTECTION DES COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II	49
2.1. Immunoempreinte ponctuelle	49
2.2. ELISA	52
2.3. Immunoempreinte de type « Western »	55
3. ANALYSE DE LA STABILITÉ DES COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II I-E ^k ET I-E ^p	58
4. OPTIMISATION DE LA MÉTHODE D'ÉLUTION DES COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II	66
5. CARACTÉRISATION DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II I-E ^p STABLES	73
6. PURIFICATION DE COMPLEXES I-E ^p /EPM STABLE.....		76
DISCUSSION	84
1. PURIFICATION DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II STABLES	85
1.1. Nécessité d'une lignée cellulaire témoin	86
2. CARACTÉRISATION DES ANTICORPS 14.4.4S, 17.3.3S ET 2B6.B8	87
3. DÉTERMINATION D'UNE MÉTHODE DE DÉTECTION DES COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II STABLES	87

3.1. Causes potentielles de l'instabilité des		
molécules I-E ^P	89
3.2. Caractérisation des complexes I-E ^P /EPM stables	94
CONCLUSION	97
LISTE DES RÉFÉRENCES	99
ANNEXES	109

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1 :** Structure des molécules du CMH de classe I et des molécules du CMH de classe II.
- FIGURE 2 :** Biosynthèse des molécules du CMH de classe I et des molécules du CMH de classe II.
- FIGURE 3 :** Réactivité du clone de cellule T 2.102.
- FIGURE 4 :** Spécificité des anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 par analyse en cytométrie en flux.
- FIGURE 5 :** Spécificité des anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 par immunoempreinte ponctuelle.
- FIGURE 6 :** Détection de complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^p stables par immunoempreinte ponctuelle.
- FIGURE 7 :** Détection de complexes du CMH de classe II I-E^k stables par ELISA.
- FIGURE 8 :** Détection de complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^p stables par immunoempreinte de type « Western ».
- FIGURE 9 :** Stabilité des complexes du CMH de classe II I-E^k à différents pH.
- FIGURE 10 :** Instabilité des complexes du CMH de classe II I-E^p dans le tampon d'élution diéthylamine.

FIGURE 11 : Instabilité des complexes du CMH de classe II I-E^P provenant de splénocytes de souris, dans le tampon d'élution diéthylamine.

FIGURE 12 : Instabilité des complexes du CMH de classe II I-E^P dans différents tampons d'élution.

FIGURE 13 : Stabilité des complexes du CMH de classe II I-E^P dans différents tampons d'élution.

FIGURE 14 : Comparaison de l'élution des complexes du CMH de classe II I-E^k dans différents tampons.

FIGURE 15 : Comparaison de la stabilité thermique des complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^P.

FIGURE 16 : Comparaison de la quantité de complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^P présents à la surface des cellules CH27-E^P/EPM.

FIGURE 17 : Purification de complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^P par chromatographie d'affinité.

FIGURE 18 : Test d'activation d'hybridomes à partir de complexes du CMH de classe II I-E^P purifiés.

FIGURE 19 : Localisation des résidus polymorphiques entre les molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^P.

FIGURE 20 : Construction d'un allomimotope (EPM) présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P et reconnu par la cellule T 2.102.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Génération d'une lignée cellulaire exprimant de façon constitutive des complexes CMH II I-E^P/EPM : CH27-E^P/EPM.

Annexe 2 : Test d'activation d'hybridomes à partir de complexes du CMH de classe II I-E^P purifiés.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-ME	:	2-mercaptoéthanol
°C	:	degré celcius
cm	:	centimètre
D.O.	:	densité optique
ECL	:	chimoluminescence
ELISA	:	enzyme-linked immunosorbent assay
g	:	gramme
h	:	heure
HEPES	:	hydroxyethylpiperazine-N-2'-ethane-sulfonic acide
IgG	:	immunoglobuline d'isotype G
M	:	Molaire
MEGA-8	:	octanoyl-N-methylglucamide
MEGA-9	:	nonanoyl-N-methylglucamide
mg	:	milligramme
min	:	minute
ml	:	millilitre
mM	:	millimolaire
nm	:	nanomètre
PBS	:	phosphate buffer salin
PMSF	:	phenyl methyl sulfonyl fluoride
SA-HRP	:	streptavidine-horse radish peroxidase
SA-PE	:	streptavidine-phyco-erythrine
SDS	:	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	:	SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SVF	:	sérum de veau fœtal
SBV	:	sérum bovin de veau
TMB	:	tetramethylbenzidine
µl	:	microlitre

µg : microgramme

INTRODUCTION

L'identification d'épitopes (peptides) naturels reconnus par des lymphocytes T spécifiques est une étape essentielle au développement de nouveaux vaccins ou d'approche immuno-thérapeutiques, que ce soit au niveau du cancer, des maladies infectieuses, de l'autoimmunité ou du rejet de greffe d'organes. Toutefois, l'approche biochimique traditionnelle s'avère difficilement réalisable pour l'identification de peptides associés aux antigènes du CMH de classe II, due à un faible nombre de complexes peptides/CMH exprimés à la surface de la cellule, ou à l'instabilité de ces complexes. Suite à leur formation, les complexes du CMH de classe II/peptides sont généralement stables (Buus *et al.*, 1986). Toutefois, différents facteurs peuvent influencer cette stabilité. En effet, la présence d'une faible liaison entre les chaînes α et β des hétérodimères ou la présence d'une force de liaison fragile entre le peptide et la molécule du CMH de classe II peuvent déstabiliser les complexes. La stabilité des complexes du CMH de classe II est fondamentale dans la réponse des cellules T (Reay *et al.*, 1992; Weenink et Gautam, 1997). Ainsi, suite à la démonstration directe de la stimulation d'une cellule T par un peptide physiquement associé à une molécule du CMH de classe II, la structure des complexes du CMH de classe II/peptides ainsi que la façon dont ils agissent dans une réponse immunitaire ont été fortement étudiés (Babbitt *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1996). Depuis quelques années, plusieurs études ont porté sur les interactions de l'antigène avec la molécule du CMH de classe II. Il a entre autres été démontré que des conditions précises étaient nécessaires pour l'isolement de ces protéines sous une forme active et fonctionnelle (Luescher *et al.*, 1988; Luescher et Unanue, 1990).

Les peptides du soi liés aux molécules du CMH jouent un rôle critique dans l'alloréactivité (Crumpacker *et al.*, 1992; Ignatowicz *et al.*, 1996; Kuzushima *et al.*, 1995; Miyazaki *et al.*, 1996; Panina-Bordignon *et al.*, 1991; Rotzschke *et al.*, 1991; Udaka *et al.*, 1992). Principalement tous les progrès réalisés sur l'identification et la caractérisation des peptides du soi dans l'allorecognition proviennent de systèmes impliquant des molécules du CMH de classe I (Frelinger et McMillan, 1996). Toutefois, même si de grands progrès ont été réalisés sur la nature du peptide, la façon dont le TCR reconnaît un alloligand est toujours méconnu (Daniel *et al.*, 1998b).

Malheureusement, très peu d'informations sont disponibles sur l'alloréactivité des molécules du CMH de classe II et l'implication de leurs peptides, qui pourtant sont reconnues pour être cliniquement aussi importantes que les molécules du CMH de classe I (Fink *et al.*, 1986; Lechler *et al.*, 1990b; Matis *et al.*, 1987; Panina-Bordignon *et al.*,

1991; Vella *et al.*, 1997). Ce manque d'informations est dû entre autres, à l'absence de modèle impliquant des complexes du CMH de classes II/peptides dans lequel deux ligands, reconnus par le même TCR, sont identifiés et caractérisés (Daniel *et al.*, 1998a).

Le but de cette étude était de purifier et de caractériser la molécule du CMH de classe II I-E^P stable par l'optimisation des protocoles de purification. Le modèle murin que nous avons utilisé pour cette étude est basé sur un clone de cellules T CD4+ (2.102) (Grakoui *et al.*, 1998), spécifique pour le peptide Hb(64-76) lorsqu'il est présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^k. Ce clone de cellule T est également alloréactif contre la molécule du CMH de classe II I-E^P (Daniel *et al.*, 1998a). Le système d'antigène Hb(64-76)/I-E^k est idéal pour l'étude de l'alloréactivité des molécules du CMH de classe II puisqu'il est bien caractérisé biologiquement et biochimiquement (Evavold *et al.*, 1992; Lorenz et Allen, 1988b; Wettstein, 1991). Toutefois, l'allopeptide naturel présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P et reconnu par la cellule T 2.102 est toujours inconnu. Afin d'obtenir un témoin efficace pour l'identification et la purification de complexes I-E^P/allopeptides naturels, un allomimotope (EPM) a été généré par l'équipe de Daniel et collègues par criblage d'une banque peptidique combinatoire dont les sites d'encrages à la molécule I-E^P ont été sélectionnés selon un motif préalablement identifié. L'allomimotope EPM est donc reconnu par la cellule T 2.102 lorsqu'il est présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P formant ainsi le complexe du CMH de classe II I-E^P/EPM (Daniel *et al.*, 1998b). La lignée cellulaire CH27-E^P/EPM, exprimant une densité élevée de complexes I-E^P/EPM, servira donc de témoin pour la purification de complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides stables.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. HISTORIQUE

La recherche sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) a commencé au tout début du siècle, par des analyses de tumeurs transplantées entre souris. En 1916, il a été démontré que différents gènes dominants influençaient les greffes de tumeurs allogéniques (Little *et al.* 1916). Toutefois, il fut ensuite démontré que des jumeaux identiques ne rejetaient pas les greffes de peaux (isotransplantation) (Bover, 1927). Des études sur des facteurs génétiques influençant la transplantation ont été poursuivies et le CMH des souris a finalement été identifié (Gorer, 1937) et caractérisé (Snell, 1948). Le CMH des humains a été découvert de façon indépendante quelques années plus tard. En effet, il a été observé que le sang de patient ayant subi une transfusion contenait des anticorps qui agglutinaient les leucocytes (Dausset, 1958). Le complexe majeur d'histocompatibilité se nomme donc ainsi puisque ces gènes contrôlent la compatibilité de greffes (Rhodes et Trowsdale, 1999). Le rôle principal des molécules du CMH est de lier des peptides dérivés d'antigènes peptidiques et de les présenter aux cellules spécifiques à l'antigène. Les molécules du CMH permettent donc d'activer la réponse immunitaire adaptative (Viret et Janeway, 1999).

Le CMH s'étend sur 2-3 centimorgans d'ADN et contient plus de 50 gènes chez l'homme (Dittel *et al.*, 1997). La région du CMH se situe sur le chromosome 6 chez l'humain (HLA pour Humain Leukocyte Antigens) et le chromosome 17 chez la souris (H-2). Le CMH se compose de plusieurs loci hautement polymorphiques, divisés en trois classes (Little et Parham, 1999; Rhodes et Trowsdale, 1999). Les humains expriment des molécules du CMH de classe I HLA-A, HLA-B et HLA-C et les molécules du CMH de classe II HLA-DR, HLA-DP et HLA-DQ. Les molécules du CMH de classe I murine sont H2-K, H2-D et H2-L alors que les molécules du CMH de classe II murines sont I-E et I-A (Little et Parham, 1999). Le CMH de classe III code pour différents types de protéines qui peuvent être impliquées dans les fonctions immunitaires ou non. Par contre, cette région n'est pas impliquée dans la présentation d'antigènes. Aujourd'hui, avec l'utilisation de techniques modernes, plusieurs nouveaux loci polymorphiques ont été identifiés dans le CMH (Begovich et Erlich, 1995) et des nouveaux allèles sont découverts continuellement (Bodmer *et al.*, 1995).

2. DEUX CLASSES DE MOLÉCULES DU CMH

Deux types de molécules du CMH permettent la surveillance, par le système immunitaire, de l'environnement extracellulaire et intracellulaire par la présentation de fragments de plusieurs protéines du soi et du non-soi à la population circulante de cellules T : les molécules du CMH de classe I et les molécules du CMH de classe II (Weenink et Gautam, 1997). Les molécules du CMH de classe I et de classe II sont des glycoprotéines de surface membranaire dont la structure générale et la fonction sont semblables. Les molécules du CMH de classe I peuvent être exprimées sur toutes les cellules nucléées, tandis que les molécules du CMH de classe II sont exprimées constitutivement sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les lymphocytes B, les macrophages-monocytes, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales thymiques et certains épithéliums (Colombani, 1993). Les CPA sont des cellules spécialisées qui vont pouvoir dégrader les antigènes en fragments peptidiques et les présenter via les molécules du CMH exprimées à la surface cellulaire et en association avec des molécules nécessaires pour la stimulation des lymphocytes (Colombani, 1993; Janeway et Travers, 1997).

2.1. Les molécules du CMH de classe I

Le système immunitaire possède différentes stratégies afin d'éliminer les infections. En effet, les molécules du CMH de classe I vont présenter principalement des peptides endogènes (Weenink et Gautam, 1997) dérivant donc de cellules infectées par des virus ou par des bactéries vivant dans le cytosole. Ensuite, les complexes du CMH de classe I/peptides seront reconnus par des cellules T cytotoxiques, caractérisées par la présence de molécules CD8 exprimées à la surface cellulaire. Le rôle de ces cellules T CD8⁺ est principalement d'éliminer l'infection en tuant les cellules infectées afin de prévenir toutes nouvelles sources de particules virales et de bactéries cytosoliques. Les molécules du CMH de classe I peuvent également être impliquées dans l'immunité anti-tumorale. L'identification moléculaire des antigènes de transplantation spécifiques de tumeurs (TSTA) a démontré que les tumeurs pouvaient présenter entre autres, des peptides issus de protéines cytoplasmiques capables d'être présentés par des molécules du CMH de classe I à des cellules T CD8⁺ (Janeway et Travers, 1997).

2.2. Les molécules du CMH de classe II

Les molécules du CMH de classe II présentent principalement des peptides exogènes provenant de pathogènes ou de leurs produits se retrouvant dans des compartiments vésiculaires. Les complexes du CMH de classe II/peptides nouvellement formés sont reconnus par des cellules T caractérisées par l'expression membranaire de la molécule CD4. Les lymphocytes T CD4⁺ permettent également l'activation de plusieurs autres cellules. Il existe deux classes fonctionnelles de cellules T CD4⁺ : les cellules Th1 ou cellules T inflammatoires et les cellules Th2 ou cellules T auxiliaires. Les cellules T inflammatoires activent entre autres, les macrophages afin d'éliminer les bactéries intravésiculaires présentes dans les cellules, tandis que les cellules T auxiliaires activent les cellules B permettant ainsi la production d'anticorps (Viret et Janeway, 1999; Weenink et Gautam, 1997). La stimulation des lymphocytes T est donc dépendante des interactions avec des cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules T stimulées vont ensuite libérer certaines molécules effectrices qui pourront atteindre les cellules-cibles et contribuer au recrutement de nouvelles cellules effectrices (Weenink et Gautam, 1997).

Les cellules présentatrices d'antigènes typiques comme les cellules B disposent de plus de 1×10^5 molécules du CMH de classe II à leur surface cellulaire. Il est maintenant connu que le nombre minimum de complexes du CMH de classes II exprimées à la surface cellulaire nécessaire pour la reconnaissance, la stimulation et la prolifération de la cellule T est d'environ 10^2 (Demotz *et al.*, 1990). Il est néanmoins possible qu'une seule cellule puisse présenter jusqu'à 1000 différents types de complexes du CMH de classe II/peptides à une concentration assez élevée pour être biologiquement significatif (Weenink et Gautam, 1997).

3. STRUCTURE DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE I ET II

3.1. Structures des molécules du CMH de classe I

La molécule du CMH de classe I a été cristallographiée la première fois en 1987 (Bjorkman *et al.*, 1987). Cette dernière est formée de deux chaînes : une chaîne α et la β 2-microglobuline. La chaîne α (environ 44 kDa) est codée dans le locus génique du CMH et est insérée dans la membrane, alors que la β 2-microglobuline est liée de façon

non-covalente et n'est pas codée par le CMH. La molécule possède quatre domaines dont trois sont formés par la chaîne α et un formé par la β 2-microglobuline. Les domaines α 3 et la β 2-microglobuline possèdent une structure plissée ressemblant fortement à un domaine de type immunoglobuline. Les domaines α 1 et α 2 forment un sillon à la surface de la molécule qui permet la liaison des peptides. Le sillon peptidique est formé d'une plate-forme de huit brins anti-parallèles sur un feuillet β localisé sous deux hélices α anti-parallèles (Colombani, 1993; Rammensee et al., 1995) (Figure 1A).

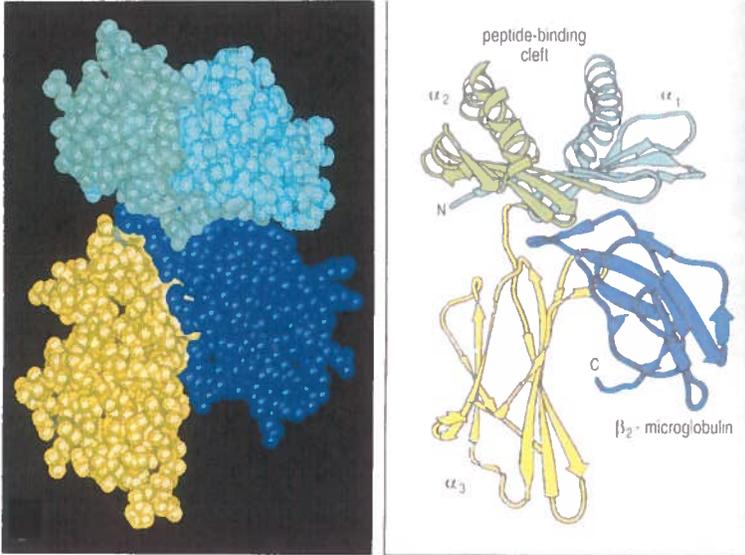
3.2. Structures des molécules du CMH de classe II

La structure cristallographique d'une molécule du CMH de classe II a été publiée pour la première fois en 1993 (Brown *et al.*, 1993). Les molécules du CMH de classe II sont formées de deux chaînes de tailles similaires, soit les chaînes α et β . Les deux chaînes s'insèrent dans la membrane, elles ne sont pas liées de façon covalente et forment quatre domaines distincts. De plus, la chaîne α (31-34 kDa) est plus glycosylée que la chaîne β (26-29 kDa) (Rammensee et al., 1995). La structure cristallographique de la molécule du CMH de classe II démontre une structure plissée très semblable à celle de la molécule du CMH de classe I (Jones, 1997). Les domaines α 2 et β 2 supportent les domaines N-terminaux α 1 et β 1, qui forment, avec une plate-forme β plissée et 2 hélices α , la niche peptidique (Nelson et Fremont, 1999). La molécule du CMH de classe II possède également des domaines variables principalement retrouvés dans le domaine β 1 en rapport avec la fonction de présentation de la molécule ainsi que des domaines conservés qui assurent le maintien de la structure générale de la molécule (Little et Parham, 1999) (Figure 1B).

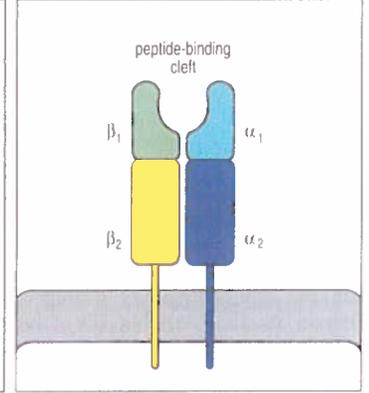
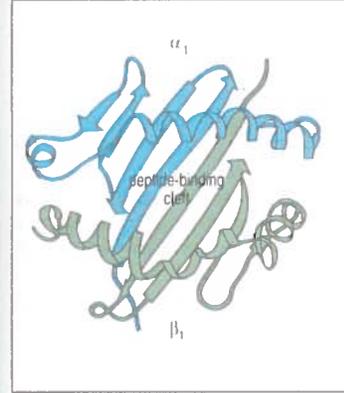
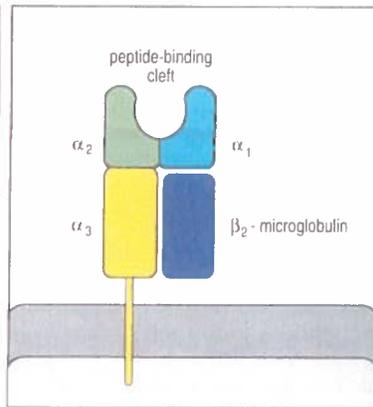
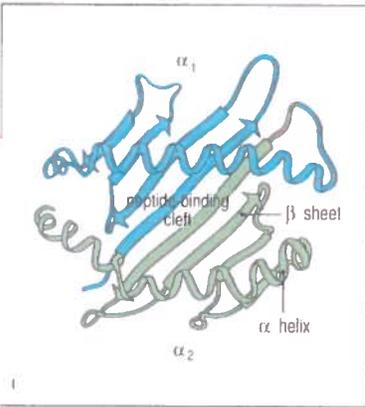
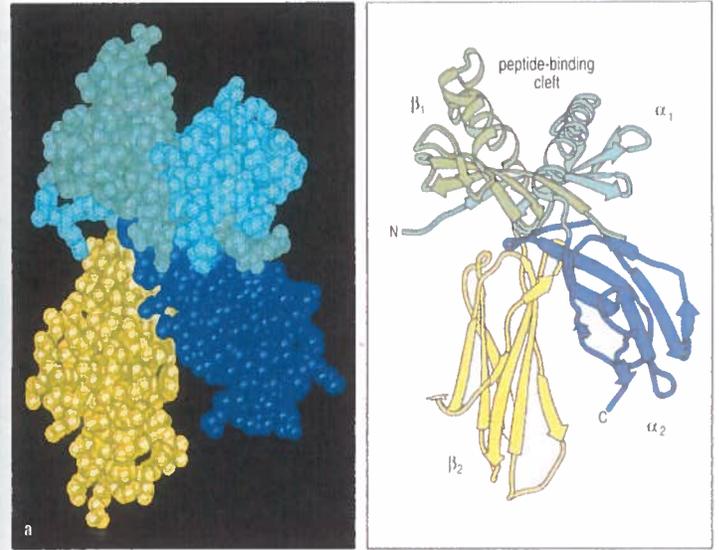
La différence majeure entre les deux classes de molécules du CMH se situe aux extrémités du sillon de liaison du peptide. En effet, elle est ouverte aux deux extrémités des molécules du CMH de classe II alors qu'elle est complètement fermée dans les molécules du CMH de classe I (Weenink et Gautam, 1997). La molécule du CMH de classe II peut donc accueillir des peptides d'une plus grande taille (13 à 17 acides aminés) que ceux de la molécule du CMH de classe I (environ 9 acides aminés) (Jones, 1997).

Figure 1 : Structure des molécules du CMH de classe I (A) et des molécules du CMH de classe II (B). Figure tirée de Janeway et Travers, 1997.

A)



B)



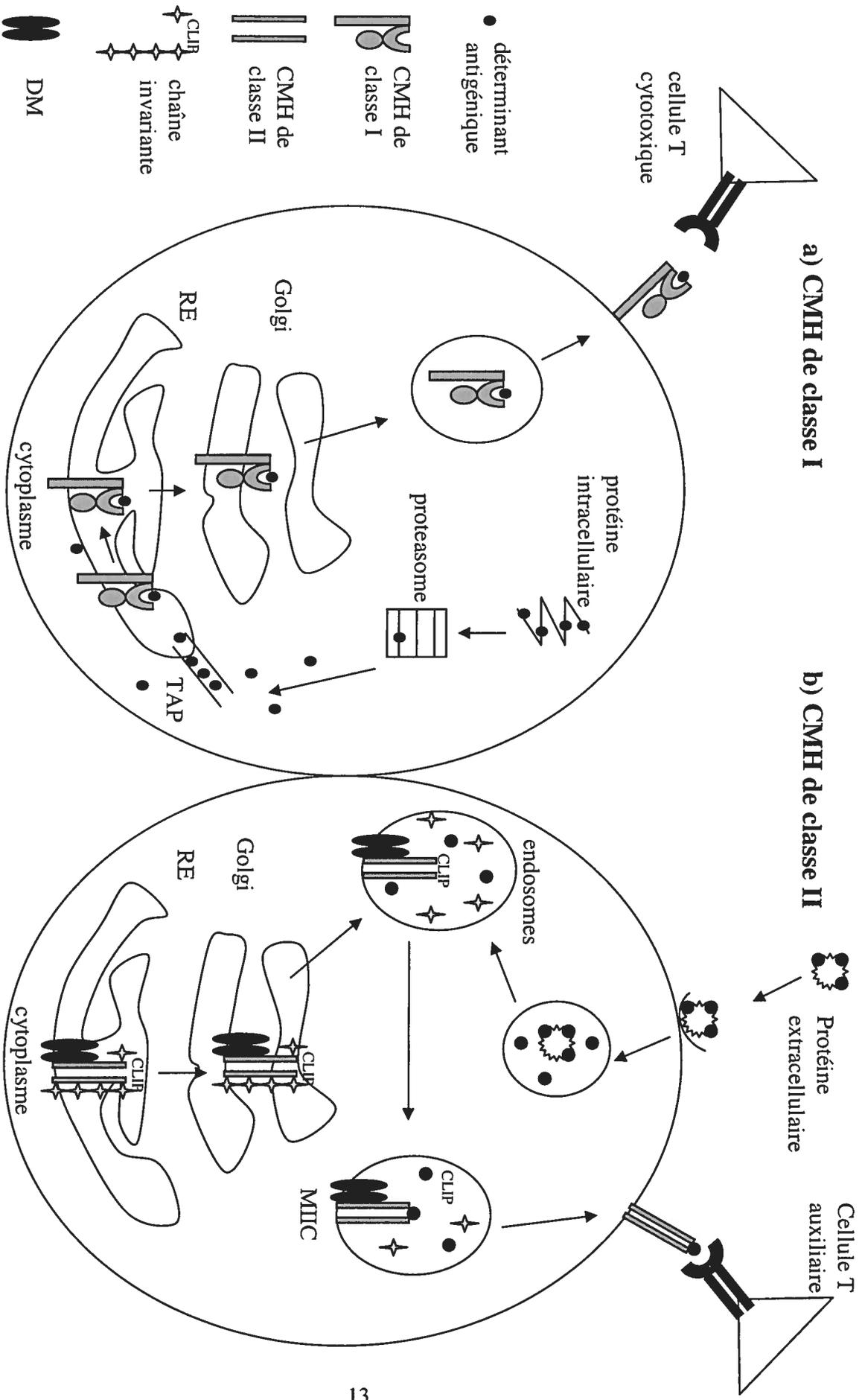
4. BIOSYNTHÈSE DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II

La biosynthèse des molécules du CMH de classe II débute dans le réticulum endoplasmique comme toutes les glycoprotéines de surface membranaire. Suite à la traduction de l'ARNm, les chaînes α et β s'associent de façon non-covalente afin de former des hétérodimères $\alpha\beta$ (Pieters, 1997a). Lors de leur biosynthèse, les chaînes α et β peuvent s'associer en moins de deux minutes (Kvist *et al.*, 1982). Les molécules du CMH de classe II nouvellement synthétisées doivent être protégées contre la liaison prématurée de peptides transportés dans la lumière du réticulum endoplasmique. Ces peptides proviennent généralement du transporteur TAP utilisé lors de la biosynthèse des molécules du CMH de classe I ou de polypeptides en voie de synthèse (Pieters, 1997b; Weenink et Gautam, 1997). Pour les molécules du CMH de classe II, ce n'est pas l'absence de peptides de grandeurs appropriées provenant du transporteur TAP qui prévient la liaison de peptides dans le réticulum endoplasmique comme pour la molécule du CMH de classe I, mais plutôt, l'interaction d'un troisième polypeptide nommé la chaîne invariante (Ii) (Weenink et Gautam, 1997) (Figure 2).

4.1. La chaîne invariante

La chaîne invariante est une protéine membranaire intégrale de type II d'environ 31 à 43 kDa (Sung et Jones, 1981). L'association de cette molécule spécialisée permet d'éviter la liaison prématurée de peptides aux molécules du CMH de classe II dans le réticulum endoplasmique et lors du transport vers des endosomes spécialisés. De plus, la formation de complexes avec la chaîne invariante est critique pour la stabilisation des hétérodimères $\alpha\beta$ nouvellement formés (Nordeng et Bakke, 1994; Weenink et Gautam, 1997). Suite à leur synthèse, les chaînes invariantes forment des complexes homotrimériques engendrant ainsi la formation de ponts disulfures inter-chaînes au niveau des queues cytoplasmiques des protéines. Ces trimères s'associent ensuite de façon non-covalente à trois dimères $\alpha\beta$ de classe II afin de former des complexes $\alpha\beta$:Ii (Nelson et Fremont, 1999). La formation de ces complexes est facilitée par la liaison d'une protéine présente dans le réticulum endoplasmique nommée la calnexine. Lorsque la calnexine est libérée, les complexes sont transportés au-delà du réticulum endoplasmique (Pieters, 1997a; Weenink et Gautam, 1997). Les molécules non-complexées avec une chaîne invariante sont retenues dans le réticulum endoplasmique et s'accumulent dans la cellule (Cresswell, 1996). En effet, la chaîne invariante possède

Figure 2 : Biosynthèse des molécules du CMH de classe I (A) et des molécules du CMH de classe II (B).



Adaptée de Weenink et Gautam (1997)

également une seconde fonction qui permet d'orienter le transport de la molécule du CMH de classe II du réticulum endoplasmique via un compartiment endosomal spécialisé (Cresswell, 1996; Nordeng et Bakke, 1994).

4.2. Compartiments spéciaux

Suite à la liaison de la chaîne invariante, les complexes $\alpha\beta$:Ii vont parcourir plusieurs étapes dans le temps afin d'être exprimés à la surface cellulaire en complexes stables. Les complexes $\alpha\beta$: Ii atteignent les compartiments spéciaux environ quatre heures suivant leur formation. Ces complexes formés par les hétérodimères $\alpha\beta$ du CMH de classe II associés à la chaîne invariante sont maintenus pendant deux à trois heures dans les compartiments endosomaux spéciaux. Pendant ce temps, la chaîne invariante est clivée à divers endroits selon différentes étapes ordonnées à l'aide de protéases. Les enzymes de dégradation comme les cathepsines B, D et E sont retrouvées en très grande concentration dans les différents compartiments lysosomaux. Ces enzymes deviennent actives de façon optimale à des pH acides. Le clivage de la chaîne invariante se fait selon un ordre dans lequel les premiers événements génèrent une forme tronquée de la chaîne invariante. Cette dernière reste liée à la molécule du CMH de classe II toujours présente dans le compartiment protéolytique (Pieters, 1997a; Weenink et Gautam, 1997). Lors d'une deuxième étape de clivage, la molécule du CMH de classe II est libérée de la chaîne invariante, mais reste liée à un petit fragment nommé CLIP (Class II-associated invariant chain peptide) (Nelson et Fremont, 1999). La présence d'un compartiment vésiculaire spécialisé, nommé le MIIC (CMH class II compartment) a été découvert suite à des études par microscopie électronique, sur la localisation intracellulaire des molécules du CMH de classe II et des chaînes invariantes. Le clivage final de la chaîne invariante aurait donc lieu dans ce compartiment spécial permettant ainsi le chargement d'un peptide antigénique sur la molécule du CMH de classe II (Pieters, 1997a).

4.3. Le fragment CLIP

Les fragments CLIP dérivent principalement d'une région de la chaîne invariante qui est critique dans les interactions responsables de la liaison entre la molécule du CMH de classe II et la chaîne invariante. Le peptide CLIP est généralement capable de se lier à la majorité des molécules du CMH de classe II. Les molécules du CMH de classe II qui ont toujours un fragment CLIP associé restent toujours protégées contre la liaison d'autres

peptides antigéniques. Le peptide CLIP doit être dissocié ou déplacé pour que la molécule du CMH de classe II puisse fixer un peptide qui a été apprêté et ensuite le présenter à la surface cellulaire (Malcherek *et al.*, 1995; Riberdy *et al.*, 1992).

Même si le peptide CLIP se lie à la molécule du CMH de classe II dans les mêmes sites de liaison et dans une conformation semblable à celle d'un peptide, il existe une différence majeure entre les deux types de liaison. En effet, il a été démontré que les interactions du peptide CLIP avec la molécule du CMH de classe II ne permettent généralement pas la formation de dimères possédant une forte stabilité dans le détergent SDS, contrairement aux complexes formés par les molécules du CMH de classe II/peptides (Malchereck, 1995; Weenink et Gautam, 1997). La stabilité en SDS est par contre une mesure indirecte de la force de liaison du peptide aux molécules du CMH. Il est donc primordial que la liaison soit différente pour le peptide CLIP, puisque si les complexes CLIP : $\alpha\beta$ de classe II pouvaient prendre une conformation très stable et résistante au détergent SDS, il deviendrait alors très difficile, voir même impossible de dissocier le fragment CLIP pour le chargement éventuel d'un peptide antigénique (Weenink et Gautam, 1997).

Le peptide CLIP possède deux régions fonctionnelles. La première, la région C-terminale, est responsable de l'inhibition de la liaison du peptide et occupe le sillon de liaison peptidique. La libération du fragment CLIP est alors effectuée par une deuxième région nommée la région N-terminale. Cette dernière interagit avec des sites effecteurs sur la molécule DM afin de provoquer un réarrangement conformationnel qui déstabilise les contacts essentiels dans le sillon de liaison peptidique entre la molécule du CMH de classe II et la région C-terminal de CLIP (Gautam *et al.*, 1995).

4.4. La molécule DM

L'hétérodimère DM est une molécule de type classe II nommée HLA-DM chez l'humain et H2-M chez la souris. Les chaînes α et β sont codées près des gènes TAP et LMP dans la région de classe II du CMH. Cet hétérodimère $\alpha\beta$ ressemblant aux molécules du CMH de classe II, ne nécessite pas la présence d'un peptide pour être stable, contrairement aux molécules du CMH de classe II. Le rôle exact de la molécule DM reste toujours à être déterminé. La molécule DM est principalement retrouvée dans

les compartiments spéciaux MIIC intracellulaires et n'est généralement pas exprimée à la surface cellulaire due à la présence de motifs tyrosine sur sa queue cytoplasmique DM β qui permettent un signal rapide d'internalisation empêchant ainsi son expression à la surface cellulaire (Weenink ad Gautam, 1997). La molécule DM semble nécessaire pour l'échange entre le peptide CLIP et les peptides antigéniques. Cette dernière catalyse donc le chargement du peptide sur la molécule du CMH de classe II (Lechler *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1991). Sous les conditions acides des compartiments spéciaux, la molécule DM induit un changement conformationnel de l'hétérodimère $\alpha\beta$ de classe II permettant ainsi la dissociation du peptide CLIP. La molécule du CMH de classe II acquiert ensuite une conformation parfaite pour l'accueil d'un peptide antigénique. La liaison des peptides matures peut être observée environ 30 minutes suivant l'entrée des complexes $\alpha\beta$: li dans les compartiments spéciaux (Qiu *et al.*, 1994). La molécule DM reste toujours associée à la molécule du CMH de classe II afin de prévenir l'expression à la surface cellulaire de molécules de classe II vides (Sanderson et Shastri, 1994). Le signal causant la dissociation de DM n'est pas encore parfaitement connu. Il a, par contre, été suggéré que le changement conformationnel de la molécule du CMH de classe II suite à la liaison du peptide antigénique provoquerait cette dissociation. Finalement, suite au chargement du peptide antigénique, il est possible d'observer la présence de complexes du CMH de classe II/peptides à la surface cellulaire en moins d'une heure (Weenink et Gautam, 1997).

La molécule DM est importante pour le chargement d'une grande variété de peptides antigéniques puisque des études ont démontré que des souris déficientes pour la molécule H2-DM ne présentaient pas de diversité peptidique. Par contre, ces souris exprimaient une quantité normale de complexes du CMH de classe II majoritairement remplis du peptide CLIP (Nelson et Fremont, 1999).

4.5. Entrée des protéines exogènes

L'entrée des protéines exogènes dans les cellules se fait par phagocytose ou endocytose (Pieters, 1997a). Les protéines restent ensuite enfermées dans des vésicules endosomales dans lesquelles elles seront dégradées pour former des fragments peptidiques, par l'augmentation continue de l'acidité jusqu'à la formation d'un lysosome où le pH acide peut atteindre 4,5 à 5,0. L'acidification des vésicules active donc des protéases qui dégradent l'antigène. Les cathepsines B, C, D et E ainsi que la cathepsine L

qui est l'enzyme la plus active dans cette famille de protéases, font toutes parties des enzymes de dégradation présentes dans les endosomes (Weenink et Gautam, 1997).

5. LIAISON DU PEPTIDE À LA MOLÉCULE DU CMH DE CLASSE II

Il est maintenant bien connu que la stabilité des molécules du CMH de classe II est dépendante de la liaison du peptide (Chicz *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1992). Il reste par contre toujours très difficile de prédire quels peptides pourront se lier aux molécules du CMH de classe II. Les molécules du CMH de classe II lient une grande variété de peptides, mais il y a généralement un motif de liaison du peptide caractéristique pour chacun des allèles du CMH contrôlé par quelques acides aminés du peptide (Fremont *et al.*, 1996). Des études ont démontré que la structure plus ouverte du sillon peptidique des molécules du CMH de classe II ainsi que la plus grande taille des peptides qui s'y lient, permettent une plus grande flexibilité dans la liaison peptidique en comparaison aux molécules du CMH de classe I. Les peptides se lient dans une conformation allongée tout au long du sillon peptidique sur les molécules du CMH de classe II. Les extrémités en N-terminale et en C-terminale du peptide antigénique sortent du sillon de liaison des peptides en passant par les extrémités ouvertes de la sillon peptidique (Nelson et Fremont, 1999).

5.1. Réseau de liens hydrogènes

Différentes interactions sont présentes au niveau du sillon peptidique afin d'assurer une bonne liaison entre la molécule du CMH de classe II et le peptide. La plus importante comprend la formation d'un réseau bien établi de liens hydrogènes observés entre le squelette du peptide et les chaînes d'acides aminés conservées et distribuées tout au long du sillon de liaison des peptides. De plus, ce réseau de liens hydrogènes reste conservé parmi les différents allèles des molécules du CMH de classe II déjà étudiées. Ces liens hydrogènes ne sont par contre pas impliqués dans les interactions avec les chaînes latérales du peptide lié. Les chaînes latérales du peptide permettent donc d'avoir des composantes indépendantes des séquences en acides aminés des chaînes centrales, expliquant ainsi pourquoi une seule molécule du CMH de classe II est capable de lier une grande variété de peptides. Parmi les résidus responsables des liens hydrogènes, il y a entre autres, trois résidus d'asparagine ($\alpha 62\text{Asn}$, $\alpha 69\text{Asn}$ et $\beta 82\text{Asn}$) qui sont conservés

pour toutes les molécules du CMH de classe II. Ces trois résidus sont positionnés afin de provoquer des liens hydrogènes entre les oxygènes carbonyle et les amides nitrogène de la chaîne centrale du peptide. De plus, d'autres résidus conservés ($\beta 81\text{His}$ et $\beta 61\text{Trp}$) sont présents afin de former des liens hydrogènes avec les carbonyles de la chaîne centrale du peptide aux positions P-1 et P-8 (Madden, 1995; Matsumura *et al.*, 1992; Nelson et Fremont, 1999).

Afin de supporter le réseau de liens hydrogènes entre la chaîne centrale du peptide et la molécule du CMH de classe II, il existe d'autres interactions différentes des résidus conservés. En effet, les atomes de la chaîne centrale en N-terminale du domaine $\alpha 1$ de l'hélice α s'alignent avec les atomes de la chaîne centrale du peptide afin de former un patron semblable de liens hydrogènes. De plus, il y également d'autres résidus encore plus polymorphiques qui participent au réseau de liens hydrogènes avec la chaîne centrale du peptide (Nelson et Fremont, 1999).

5.2. Liaisons des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$

Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ de la majorité des molécules du CMH de classe II sont reliés par un pont salin formé entre les résidus $\alpha 76\text{Arg}$ et $\beta 57\text{Asp}$. La formation de ce lien est principalement nécessaire pour stabiliser les hétérodimères $\alpha\beta$. Néanmoins, ces résidus peuvent également interagir avec la chaîne centrale du peptide en position P10, permettant ainsi la formation d'un lien hydrogène près de la région en C-terminale du peptide. Les effets combinés de tous ces liens hydrogènes permettent aux peptides de prendre une conformation en hélice polyproline de type II allongée. Dans cette conformation, le squelette peptidique se retourne dans le sillon peptidique de la molécule du CMH de classe II en laissant environ trois résidus par tour d'hélice. Le peptide présenté par la molécule du CMH de classe I est pour sa part, fixé aux deux extrémités, permettant ainsi à la partie centrale du peptide de former une arche afin de s'éloigner de la niche peptidique (Matsumura *et al.*, 1992; Nelson et Fremont, 1999).

5.3. Les différentes pochettes des molécules du CMH de classe II

Les peptides antigéniques sont formés d'une chaîne centrale et de petites chaînes latérales qui sortent souvent de la niche peptidique. Parmi ces chaînes latérales, plusieurs sont localisées directement aux dessus de la molécule du CMH de classe II. Afin

d'accommoder toutes ces différentes chaînes, le sillon de liaison aux peptides est alignée avec des acides aminés polymorphiques qui forment une série de pochettes. Le rôle principal de ces pochettes est d'augmenter la spécificité des interactions et de permettre au peptide d'enfouir une grande surface peptidique normalement exposée. Les différentes pochettes servent également à aligner le peptide dans les sites de liaisons pour que chaque séquence peptidique puisse être détectée comme un seul déterminant par le récepteur de la cellule T (TCR) (Nelson et Fremont, 1999; Stern *et al.*, 1994).

Les pochettes qui permettent la liaison du peptide par les chaînes latérales sont toutes uniques entre les différents allèles des molécules du CMH de classe II, expliquant ainsi la grande diversité des liaisons peptidiques spécifiques possibles entre les différents peptides et les molécules du CMH de classe II. En général, la majorité des peptides antigéniques se lient en utilisant seulement quelques résidus d'ancrages clés des chaînes latérales. La localisation et l'identité de chacune des chaînes latérales permettent de déterminer leur position selon les différentes caractéristiques des pochettes polymorphiques dans chaque allèle des CMH de classe II. De plus, les interactions non favorables dans une pochette peuvent être contrées par des interactions plus favorables ailleurs le long du peptide. Afin de simplifier la nomenclature, les différentes pochettes ont été nommées selon les chaînes latérales peptidiques qu'elles peuvent accueillir. Les pochettes les plus profondes et les plus souvent utilisées pour les liaisons peptidiques sont nommées P1 (pochette hydrophobe) et P9 suivies des pochettes P4 et P6. La présence de motifs de liaison peptidique spécifique aux allèles de la molécule du CMH de classe II a été déterminée suite à l'observation de la liaison dépendante pour seulement certains résidus critiques des peptides antigéniques (Nelson et Fremont, 1999; Nelson *et al.*, 1996).

Il existe maintenant plusieurs exemples dans lesquels une seule molécule du CMH de classe II peut lier différents peptides (Murphy *et al.*, 1997; Stern *et al.*, 1994). Dans chaque cas, la molécule du classe II est capable d'accommoder une nouvelle séquence peptidique contenant de petits changements des chaînes latérales qui s'enfouissent dans les pochettes. Par contre, il est difficile pour une seule pochette d'accommoder une grande variété de chaînes latérales en remplissant tous les espaces libres avec des molécules d'eau. Les molécules d'eau contribuent généralement à l'énergie de liaison nécessaire pour former les liens hydrogènes entre les peptides antigéniques et les molécules du CMH de classe II (Nelson et Fremont, 1999).

Malheureusement, il n'est pas encore possible de prédire les déterminants des cellules T en donnant la séquence d'un allèle d'une molécule du CMH de classe II. Par contre, plusieurs exemples démontrent que des peptides se lient même s'ils ne contiennent pas des motifs consensus de liaison de peptide. Par contre, ces peptides ont généralement des hauts taux de dissociation, mais peuvent quand même activer les cellules T dû à la faible quantité de complexes CMH/peptides nécessaires pour stimuler les cellules T (Nelson et Fremont, 1999).

6. STABILITÉ DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II

Suite à leur formation, les complexes du CMH de classe II/peptides sont reconnus pour être très stables (Buus *et al.*, 1986a). Cette stabilité peut être entre autres attribuée à deux facteurs importants. Premièrement, il y a la liaison des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ de la majorité des molécules du CMH de classe II par un pont salin formé entre les résidus $\alpha 76\text{Arg}$ et $\beta 57\text{Asp}$. Ensuite, il y a l'intensité de la liaison présente entre le peptide antigénique et la molécule du CMH de classe II (Weenink et Gautam, 1997). La stabilité de la molécule du CMH de classe II est primordiale lors de leur expression à la surface cellulaire afin que le répertoire des cellules T puissent reconnaître les complexes CMH/peptides. En effet, les cellules T requièrent des signaux pour leur survie, qui proviennent principalement des différentes forces de liaison créées entre le TCR et les complexes du CMH /peptides (Goldrath et Bevan, 1999). Une étude réalisée par Reay et ses collègues en 1992 a permis de démontrer que la stabilité du peptide est importante dans la réponse des cellules T. En effet, dans cette étude, le taux de dissociation des peptides a été comparée entre différentes molécules du CMH de classe II. Suite aux résultats obtenus, il a été suggéré qu'un tel mécanisme permettait de s'assurer que les peptides ayant un faible taux de dissociation seraient capables de former une quantité suffisante de complexes exprimés à la surface cellulaire afin de stimuler les cellule T (Reay *et al.*, 1992a; Weenink et Gautam, 1997).

Des études plus récentes ont ensuite comparé la stabilité de différentes molécules du CMH de classe II. En général, les molécules du CMH de classe II murines I-A et I-E possèdent une stabilité semblable (Carrasco-Marin *et al.*, 1996; Luescher *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1996; Schafer *et al.*, 1998). Par contre, certaines molécules du CMH de

classe II sont beaucoup moins stables, comme la molécule I-A^{G7} présente chez les souris NOD (Non-Obese Diabetic). La chaîne α des molécules du CMH de classe II I-A^{G7} est identique aux molécules du CMH de classe II I-A^d, alors que la chaîne β ^{G7} est unique. En effet, la chaîne β ^{G7} possède une sérine à la position 57 alors qu'en général les autres molécules du CMH de classe II I-A possède une asparagine à cette position. Des études ont démontré que ces molécules du CMH de classe II exprimées à la surface cellulaire étaient instables dans le détergent SDS. De plus, il a été démontré que les molécules du CMH de classe II I-A^{G7} avaient une demi-vie à la surface cellulaire très courte puisque la liaison entre le peptide et la molécule du CMH de classe II était faible (Carrasco-Marin *et al.*, 1996).

7. DIFFÉRENTES CONFORMATIONS DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II

Chacune des molécules du CMH de classe I et II existe sous différentes conformations qui peuvent être distinguées par la réactivité avec des anticorps appropriés. De plus, il est possible d'analyser les molécules du CMH de classe II sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) permettant ainsi, par une façon convenable mais artificielle, de visualiser et de comparer les différentes conformations. Lorsque les molécules du CMH de classe II sont analysées par SDS-PAGE dans des conditions non réductrices et non bouillies, il est possible d'observer trois conformations distinctes. La première, la forme compacte, est un dimère qui migre à une masse moléculaire d'environ 63 kDa pour les molécules du CMH de classe II humaines et à environ 52 à 56 kDa pour celles des souris. C'est la conformation observée le plus fréquemment puisqu'elle est formée de la majorité des peptides liés à la molécule du CMH de classe II. La deuxième conformation, la forme relâchée, est plus diffuse et migre à environ 63-67 kDa. Cette conformation représente un intermédiaire partiellement dissocié qui se produit généralement dans des conditions plus dénaturantes. Finalement, la troisième conformation, la forme dissociée, est présente en complète absence de stabilité. Les molécules du CMH de classe II peuvent être facilement dénaturées à l'aide d'agents dénaturants et ainsi, migrer en chaînes α et β dissociées (Schafer *et al.*, 1998; Weenink et Gautam, 1997). Suite à des études plus approfondies, il a été également démontré qu'une quatrième conformation pouvait être observée à environ 120 kDa. En effet, les molécules du CMH de classe II ont l'habileté intrinsèque de former des super-dimères $(\alpha\beta)_2$ en l'absence d'autres

composantes cellulaires (Schafer *et al.*, 1998).

8. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II

8.1. Caractérisation des séquences peptidiques

La démonstration directe de la stimulation d'une cellule T par un peptide physiquement associé à une molécule du CMH de classe II a été démontrée, il y a déjà plus de quinze ans (Babbitt *et al.*, 1985). Ce fut donc le début d'une course afin de déterminer la structure du complexe du CMH de classe II/peptides ainsi que la façon dont ces complexes exprimés à la surface cellulaire agiraient dans une réponse immunitaire. Les premières tentatives de caractériser les séquences peptidiques reconnues par la cellule T se concentraient principalement sur la définition de déterminants minimaux dans la protéine. Dans ces études, les cellules T restreintes au CMH de classe II pouvaient reconnaître des peptides aussi courts que 8 à 10 acides aminés (Allen *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1996). Néanmoins, d'autres études ont démontré qu'un fragment peptidique beaucoup plus long pouvait être présenté par des molécules du CMH de classe II. Ces études portaient principalement sur l'habileté des cellules T à reconnaître des protéines dénaturées à la surface de cellules fixées avec de l'aldéhyde (Allen *et al.*, 1984).

Effectivement, en utilisant des sondes photoréactives, il a été démontré que la partie N-terminale d'un peptide lié pouvait avoir des contacts pouvant aller jusque sur les cotés de la molécule du CMH de classe II, c'est-à-dire sur les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$ (Luescher et Unanue, 1990). De plus, des analyses par HPLC sur la forme naturelle des peptides isolés de la molécule du CMH de classe II de lymphomes de cellules B ont démontré que le fragment antigénique pouvait avoir une hétérogénéité considérable. Cette très grande hétérogénéité a ensuite été expliquée par l'analyse de séquences peptidiques naturelles puisque les peptides dérivait généralement de protéines endogènes. Il a alors été démontré par séquençage que les peptides liés aux molécules du CMH de classe II avaient des longueurs variant de 13 à 17 acides aminés et même parfois un peu plus. De plus, un seul épitope central était présent avec une extension de résidus variables en N-terminale et en C-terminale (Nelson *et al.*, 1996).

L'étude de la forme naturelle des peptides élués des molécules du CMH de classe II humaines et murines a été réalisée par plusieurs équipes (Buus *et al.*, 1988; Chicz *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1992; Marrack *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1992; Rudenski, 1991; Vignali *et al.*, 1993; Viner *et al.*, 1995). Puisque les molécules du CMH de classe II peuvent lier des peptides plus longs, il est possible que dans certains cas, la préparation protéolytique de l'antigène puisse survenir suite à la liaison à la molécule du CMH de classe II. Des études plus récentes ont démontré que l'addition de résidus en C-terminale ou en N-terminale influence également la stabilité des complexes CMH II/peptide présentes sur les CPA (Nelson *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré que l'immunogénicité de certains peptides corrèlent avec leur habileté à stabiliser le complexe CMH/peptide (Nelson *et al.*, 1993). L'épitope central peut donc être affecté par la nature des extensions en N-terminale et en C-terminale. Il a ensuite été démontré que ces résidus flottants pouvaient affecter la reconnaissance du TCR pour les complexe du CMH de classe II/peptide (Vignali et Strominger, 1994).

Même si plusieurs motifs de liaison du peptide ont été découverts récemment, ce n'est pas facile de prédire la forme précise du peptide naturel et le degré d'immunogénicité de ce dernier. De plus, les résidus qui ne sont pas responsables de l'ancrage du peptide contribuent considérablement aux interactions avec la molécule du CMH de classe II. La plupart des peptides naturels connus jusqu'à présent ne sont pas des épitopes des cellules T mais plutôt, des ligands du CMH identifié par séquençage direct (Luescher *et al.*, 1990; Rammensee *et al.*, 1995).

8.2. Conditions de purification

Depuis quelques années, plusieurs études ont porté sur les interactions de l'antigène avec la molécule du CMH de classe II. Il a été démontré que certaines conditions étaient nécessaires pour l'isolement de ces protéines sous une forme active et fonctionnelle. En effet, plusieurs procédures de purification des molécules du CMH de classe II par chromatographie d'affinité, en utilisant des anticorps immobilisés, ont été décrites par différentes équipes (Buus *et al.*, 1987; Gorga *et al.*, 1987; Quill et Schwartz, 1987; Turkewitz *et al.*, 1983; Watts *et al.*, 1984). Néanmoins, tous les paramètres critiques comme les détergents, les conditions d'élution et les procédures de concentration, diffèrent selon les méthodes de purifications utilisées. L'existence de nombreux problèmes au niveau de la reproductibilité des expériences ainsi que de

l'absence de technique standard de purification due à la grande variation des différentes molécules, ont mené l'équipe d'Unanue (1990) à déterminer des conditions nécessaires pour la purification par chromatographie affinité de la molécule du CMH de classe II I-A^k dans une forme active et fonctionnelle (Luescher et Unanue, 1990). Les effets des différents détergents, des conditions d'élution et des procédures de concentration ont été évalués par photoaffinité (Luescher *et al.*, 1988a). Bref, dans cette étude, il a été démontré que les conditions de solubilisation les plus appropriées pour la purification de molécules du CMH de classe II sont effectuée dans un tampon phosphate contenant un mélange équivalent de détergents octanoyl-N-methylglucamide (MEGA-8) et nonaoyl-N-methylglucamide (MEGA-9) (Luescher et Unanue, 1990). De plus, il a été observé que la présence d'iodoacétamine dans le tampon de solubilisation prévenait la dénaturation substantielle des molécules du CMH de classe II en prévenant les échanges disulfures entre les chaînes α et β des molécules du CMH de classe II (Cook *et al.*, 1981). Il a également été déterminé que l'élution des molécules du CMH de classe II I-A^k adsorbées sur une résine est optimal dans des conditions acides (Luescher *et al.*, 1990). En général, les procédures de purification des molécules du CMH de classe II utilisent des tampons d'élution à des pH alcalins (Babbitt *et al.*, 1986; Buus *et al.*, 1987; Gorga *et al.*, 1987; Quill *et al.*, 1987; Turkewitz, 1983; Watts *et al.*, 1984) qui pourtant semblent causer une dénaturation substantielle. Ces tampons alcalins ont été fortement utilisés puisque le détergent utilisé dans les premières études contenait du déoxycholate qui ne permettait pas l'élution à des pH faibles (Luescher *et al.*, 1990). De plus, peu d'études emploient les pH acides pour l'élution des molécules du CMH de classe II puisqu'il est reconnu que les molécules du CMH de classe I sont instables à de tels pH (4.5 à 5.0) (Revilla *et al.*, 1986; Sugawara *et al.*, 1987).

9. ALLORÉACTIVITÉ

Lors de leur maturation, les thymocytes subissent une sélection positive et négative permettant la formation d'un répertoire de cellules T périphériques capables d'interagir avec des complexes du CMH du soi présent à la surface des CPA (Kisielow et von Boehmer, 1995). Toutefois, dans le contexte de ce processus de sélection, les cellules T alloréactives demeurent bien méconnues puisqu'elles interagissent avec des molécules du CMH allogéniques avec lesquels elles n'ont jamais été en contact (Rogers et Lechler, 2001).

L'alloréactivité est définie comme étant la stimulation d'une cellule T par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité autre que les molécules du soi d'un individu de la même espèce. L'allorecognition peut se faire via deux voies distinctes. Les voies directes et indirectes d'alloréactivité diffèrent au niveau du mécanisme et également par les différentes CPA qui y sont impliquées. Les cellules T peuvent reconnaître les molécules du CMH allogéniques soit par la voie directe en tant que molécules intactes, ou soit par la voie indirecte en tant que peptides suite à une dégradation antigénique (Rogers et Lechler, 2001; Wecker et Auchincloss, 1992).

Dans la voie directe d'alloréactivité, les CPA présentent une haute densité de molécules intactes du CMH ainsi que les molécules de co-stimulation nécessaires pour une activation complète des cellules T (Sayegh et Carpenter, 1996; Vella *et al.*, 1999). La voie directe a longtemps été considérée comme la plus importante des voies d'alloréactivité, sinon la seule, compte tenu de la forte réponse de prolifération des cellules T alloréactives. En effet, les molécules du CMH allogéniques provoquent des réponses à médiation cellulaire extrêmement fortes et rapides. La fréquence de précurseurs des cellules T qui reconnaissent directement des molécules du CMH allogéniques est très élevée. Il est connu que de 1 à 10 % de toutes les cellules T d'un individu répondent à une stimulation par des cellules d'un individu allogénique (Bradley, 1996). Ce vaste répertoire alloréactif des cellules T dépasse largement le répertoire des cellules T réagissant contre des antigènes nominaux ou environnementaux (Marelli-Berg *et al.*, 1999; Rogers et Lechler, 2001). La vigueur des réponses alloréactives repose donc sur la forte fréquence des précurseurs des cellules T qui reconnaissent les molécules du CMH allogéniques, mais ces cellules T alloréactives se caractérisent aussi par la diversité de la spécificité de leur TCR (Benichou, 1999).

Deux hypothèses ont été mises de l'avant pour expliquer la haute fréquence de précurseurs des cellules T alloréactives interagissant avec les molécules du CMH allogénique. Dans le premier modèle, celui de la haute densité des déterminants, l'importance est reléguée aux molécules du CMH et non aux peptides liés. En effet, les cellules T alloréactives vont reconnaître directement les différences de résidus polymorphiques entre les molécules du CMH allogénique (Bevan, 1984). Les peptides antigéniques liés ne jouent donc pas nécessairement un rôle central. Bref, l'interaction entre le TCR et le CMH est si forte qu'elle se fait indépendamment du peptide présenté.

Dans le second modèle, celui de la complexité binaire, l'emphase porte sur l'importance du peptide. Une seule molécule du CMH allogénique peut présenter une vaste gamme de peptides du soi, ce qui permet de stimuler plusieurs clones différents de cellules T alloréactives, chacun ayant une spécificité différente pour le complexe CMH/peptide (Matzinger et Bevan, 1977). La contribution des interactions provient donc principalement de la reconnaissance du peptide par le TCR.

Cependant, il ne semble pas avoir une exclusion mutuelle entre les deux hypothèses puisque plusieurs évidences suggèrent que ces deux modèles peuvent contribuer à l'alloréactivité (Bradley, 1996). En effet, les deux hypothèses suggérées vont à l'encontre de la sélection thymique positive pour des molécules du CMH restreinte au soi. Toutefois, les similarités structurelles entre les surfaces de contact des TCR et de plusieurs allèles des molécules du CMH permettent généralement une réponse alloréactive dans le processus de sélection positive. Dans ce cas, l'alloréactivité peut être considérée comme mimant la restriction des CMH du soi et ainsi dirigée contre des nouveaux peptides qui sont liés par des molécules allogéniques et non des molécules du soi, dû aux différences dans le sillon peptidique (Lechler *et al.*, 1990; Lombardi *et al.*, 1989). Dans ce cas particulier, la haute fréquence de cellules T alloréactives serait mieux expliquée par l'hypothèse de la complexité binaire (Rogers et Lechler, 2001). Toutefois, dans un cas où il y aurait des multiples différences dans les acides aminés présents sur les surfaces de contact des TCR, il est possible que la réponse alloréactive résulte en une réaction croisée de plus grande affinité avec la structure du CMH. Dans ce cas, où l'attention des TCR est prédominante pour le polymorphisme des molécules du CMH exposées, l'hypothèse de la haute densité des déterminants peut être mieux appliquée (Merkenschlager *et al.*, 1991; Rogers et Lechler, 2001). Bref, le modèle accepté se situe entre ces deux hypothèses. L'alloréactivité est donc un phénomène qu'on peut qualifier d'hétérogène puisque parfois certains TCRs vont reconnaître un peu plus le peptide et d'autres, un peu plus le CMH (Rogers et Lechler, 2001).

10. UN MODÈLE D'ÉTUDE

Les peptides du soi liés aux molécules du CMH jouent un rôle critique dans l'alloréactivité (Crumpacker *et al.*, 1992; Ignatowicz *et al.*, 1996; Kuzushima *et al.*, 1995; Miyazaki *et al.*, 1996; Panina-Bordignon *et al.*, 1991; Rotzschke *et al.*, 1991; Udaka *et*

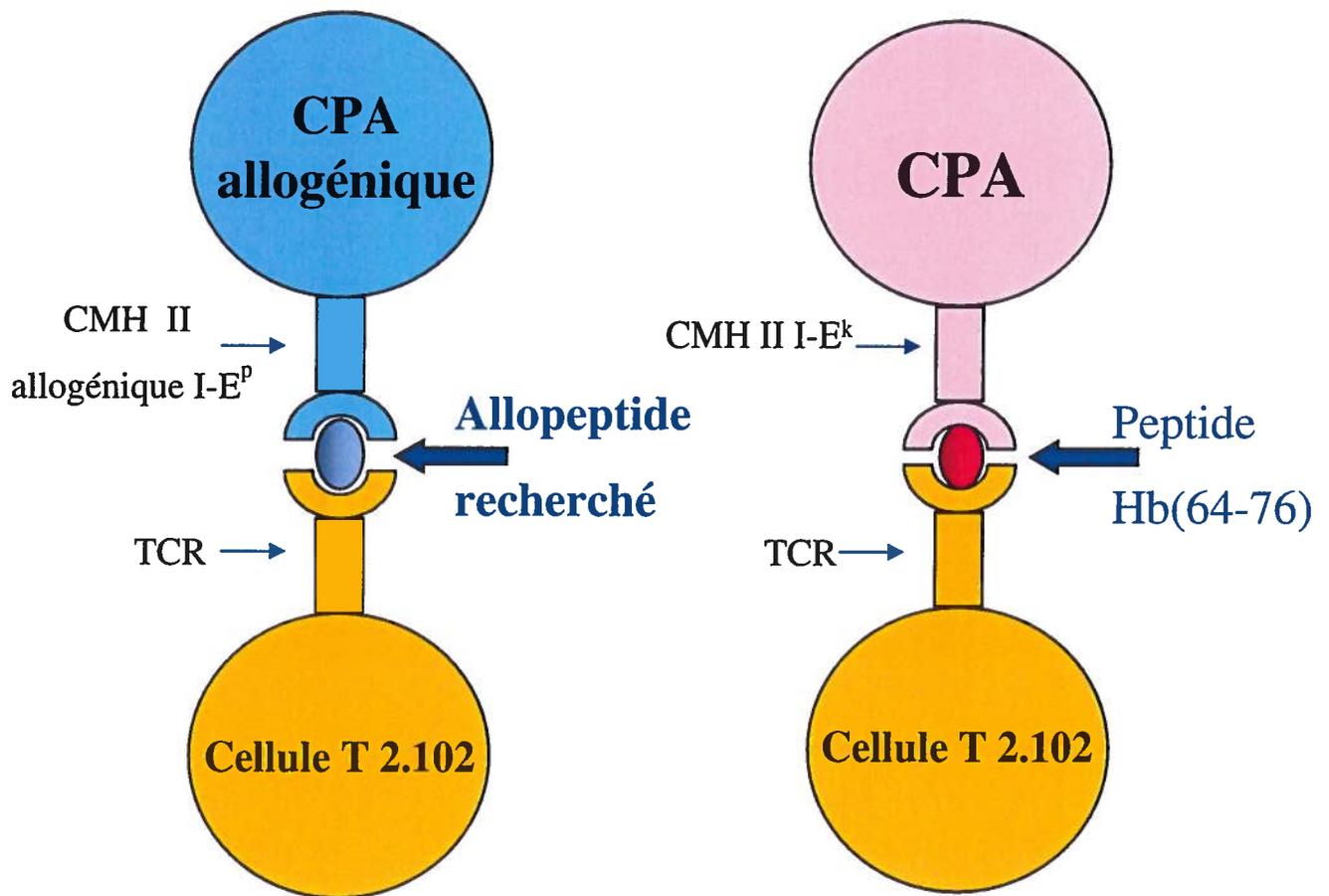
al., 1992). Principalement tous les progrès réalisés sur l'identification et la caractérisation des peptides du soi dans l'alloréaction proviennent de systèmes impliquant des molécules du CMH de classe I (Frelinger et McMillan, 1996). En effet, le système 2C est un des modèles les plus étudiés. Ce système possède entre autres deux différentes molécules allogéniques et leurs peptides correspondants qui ont été identifiés: L^d/p2Ca et H-2^{bm3}/dEV8 (Delaney *et al.*, 1998; Schlueter *et al.*, 1996; Tallquist et Pease, 1995; Udaka *et al.*, 1992). Toutefois, même si de grands progrès ont été réalisés sur la nature du peptide, la façon dont le TCR reconnaît un alloligand est toujours méconnue (Daniel *et al.*, 1998a).

De plus, très peu d'informations sont disponibles sur l'alloréactivité des molécules du CMH de classe II et l'implication de leurs peptides, qui pourtant sont reconnues pour être cliniquement aussi importantes que les molécules du CMH de classe I (Fink *et al.*, 1986; Lechler *et al.*, 1990; Matis *et al.*, 1987; Panina-Bordignon *et al.*, 1991; Vella *et al.*, 1997). Ce manque d'informations est dû entre autres à l'absence de modèle impliquant des complexes du CMH de classes II/peptides dans lequel deux ligands, reconnus par le même TCR, sont identifiés et caractérisés (Daniel *et al.*, 1998a).

Le clone de cellule T 2.102 (Daniel *et al.*, 1998a) peut être employé afin de comparer comment un TCR interagit avec un ligand nominal (restriction au soi) ainsi qu'avec un ligand allogénique (Figure 3). En effet, ce clone de cellule T reconnaît spécifiquement le peptide immunodominant Hb(64-76) lorsque ce dernier est présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^k (ligand nominal) (Evavold *et al.*, 1992). Ce déterminant immunodominant correspond aux acides aminés 64 à 76 de l'allèle *d* mineur de la chaîne β de l'hémoglobine de souris (Hb β^d mineur) (Lorenz et Allen, 1988). Le clone 2.102 a donc été généré suite à l'immunisation de souris H-2^k avec l'hémoglobine de souris. Le système d'antigènes Hb(64-76)/I-E^k est idéal pour l'étude de l'alloréactivité des molécules du CMH de classe II puisqu'il est bien caractérisé biologiquement et biochimiquement (Evavold *et al.*, 1992; Lorenz et Allen, 1988). De plus, la structure cristallographique du complexe du CMH de classe II/peptide est maintenant disponible (Fremont *et al.*, 1996).

Ce clone de cellule T 2.102 est également alloréactif exclusivement contre les splénocytes possédant un haplotype H-2^P (ligand allogénique). La reconnaissance par les cellules T 2.102 des alloantigènes exprimés sur des cellules ayant un haplotype H-2^P

Figure 3 : Réactivité du clone de cellule T 2.102



dépend entièrement de la présence de molécules intactes du CMH sur les CPA. De plus, afin d'obtenir un témoin efficace pour l'identification et la purification de complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides, un allomimotope (EPM) a été généré par l'équipe de Daniel et collègues par criblage d'une banque peptidique combinatoire dont les sites d'encrages à la molécule I-E^P ont été sélectionnés selon un motif préalablement identifié. Cet allopeptide est donc reconnu par la cellule T 2.102 lorsqu'il est présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P formant ainsi le complexe du CMH de classe II I-E^P/EPM (Daniel *et al.*, 1998b). Ainsi, l'alloréactivité directe du clone de cellule T 2.102 contre I-E^P permet de créer un modèle unique afin d'étudier et de comparer l'interaction du TCR avec un ligand nominal et un ligand allogénique grâce à un seul clonotype de cellule T. De plus, il a également été démontré que la stimulation de la cellule T 2.102 est causée par la présentation d'un allopeptide par la molécule du CMH de classe II I-E^P. En effet, différentes lignées cellulaires exprimant la molécule du CMH de classe II I-E^P ont été analysées pour leur habileté à stimuler la cellule T 2.102. Ces dernières n'ont par contre pas été stimulées. Cependant, la reconstitution de l'alloréactivité de 2.102 suite à l'ajout du peptide EPM sur des cellules exprimant I-E^P démontre clairement l'importance du peptide pour l'alloréactivité du clone de cellule T 2.102 (Daniel *et al.*, 1998a).

Toutefois, le peptide naturel présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P et permettant la stimulation de la cellule T 2.102 est toujours inconnu. L'identification d'un tel peptide permettrait d'obtenir plus d'informations sur les interactions moléculaires dans l'alloréactivité directe ainsi que de permettre une meilleure caractérisation du modèle de cellule T 2.102 utilisé entre autres dans l'étude des rejets d'allogreffes. De plus, l'identification d'un ou de plusieurs allopeptides permettrait également de vérifier comment il(s) pourrait(ent) influencer l'alloréponse *in vivo*.

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

1. CELLULES

1.1. Lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires d'origine murine ont été utilisées dans cette étude. Tout d'abord, l'hybridome 14.4.4s (Ozato *et al.*, 1980) produisant des anticorps (IgG) spécifiques pour I-E α et les hybridomes 17.3.3s (Ozato *et al.*, 1980) et 2B6.B8 (Daniel *et al.*, 1998b) produisant des anticorps (IgG) spécifiques pour les chaînes β de I-E^k et de I-E^P ont été utilisées pour la production d'anticorps. Ensuite, les cellules CH27mHEL-Hb (Vidal *et al.*, 2000) et CH27-E^P/EPM (données non publiées) qui sont des lymphomes de cellules B exprimant de façon naturelle la molécule du CMH de classe II I-E^k ont été utilisées pour la purification de complexes du CMH de classe II. De plus, les cellules CH27mHEL-Hb expriment une densité élevée de complexes du CMH de classe II I-E^k/Hb(64-76) alors que les cellules CH27-E^P/EPM ont été transfectées avec la chaîne β de la molécule du CMH de classe II I-E^P ainsi qu'avec une construction permettant l'expression constitutive de l'allomimotope EPM. Les cellules épithéliales CHO-E^k et CHO-E^P (Daniel *et al.*, 1998b) qui expriment les molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^P ont également été utilisées pour des expériences de cytométrie en flux. Finalement, la lignée cellulaire CTLL-2 (cellules dépendantes des IL-2 pour la croissance) a été utilisée afin d'évaluer l'activation des hybridomes T 2.102.

1.2. Culture cellulaire

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à 37°C, dans un incubateur humidifié et sous une atmosphère à 5 % de CO₂. Les hybridomes 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 ont été maintenues dans un milieu de croissance constitué de RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY), 10 % (v/v) de SVF (Hyclone, Logan, UT), 2 mM de Glutamax (Gibco BRL), 50 µg/ml de gentamicine (Gibco BRL) et 2 x 10⁻⁵ M de 2-mercaptoéthanol (2-ME). Les cellules CH27mHEL-Hb et CH27-E^P/EPM ainsi que l'hybridome T 2.102 ont été cultivées dans un milieu de croissance semblable mais contenant 10 % (v/v) de SVB (Hyclone). Les cellules CTLL-2 ont été cultivées dans ce même milieu mais sans l'addition de 2-mercaptoéthanol (2-ME). Finalement, Les cellules CHO-E^k et CHO-E^P ont été cultivées dans les mêmes conditions mais dans un milieu de croissance composée

de MEM- α (Gibco BRL), 10 % (v/v) de SVF, 2mM de Glutamax et 50 μ g/ml de gentamicine.

2. PRODUCTION ET PURIFICATION D'ANTICORPS

2.1. Production de surnageant d'anticorps

Une quantité finale de 1×10^8 cellules provenant d'hybridomes sécrétant des anticorps ont étéensemencées dans un flacon agitateur contenant 1 litre de milieu de culture (section 1.2) et 10mM d'HEPES (Gibco BRL). Lorsque la multiplication cellulaire a atteint le maximum de croissance sans mortalité, 1 % (p/v) de glucose a été ajouté et la concentration d'HEPES a été ajustée à 25 mM. La culture cellulaire a ensuite été recueillie lorsque la viabilité des cellules est passée sous 20 %, et centrifugée à 10 000 x g pendant 30 minutes. Le surnageant a été récupéré et conservé à 4⁰ C avec 0.05 % de NaN₃ (Sigma, St-Louis, MO).

2.2. Purification des anticorps

Les anticorps ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur une résine de protéine G-Sepharose 4 fast-flow (Amersham Pharmacia biotech, Piscataway, NJ) à 4⁰C, température à laquelle s'est effectuée toutes les étapes de purification. Un volume de 5 ml de gel a été sédimenté dans une colonne de 1,5 cm de diamètre puis lavé avec 10 volumes de tampon PBS pH 7,4. Le surnageant provenant de la culture cellulaire d'hybridomes a été adsorbé à la résine à un débit de 1 ml/minute puis la résine a été lavée de nouveau avec le tampon de lavage jusqu'à ce que la densité optique (D.O.) à 280 nm soit minimale. Des fractions de 1 ml ont été récoltées après l'élution dans un tampon 0,1 M glycine-HCl pH 2,7 à un débit de 1 ml/minute. Les fractions ont été neutralisées par l'ajout immédiat de 0,1 volume de tampon 1,0 M Tris-HCl pH 9,0. La colonne a ensuite été régénérée par le passage d'un tampon 0,1 M glycine-HCl pH 2,0 jusqu'à ce que la D.O. soit minimale. Le reconditionnement de la colonne a été fait dans un tampon PBS pH 7,4. La D.O. de chacune des fractions a été prise à 280 nm et les fractions ayant une densité optique supérieure à 0,2 ont été regroupées. La concentration d'anticorps, en mg/ml, a été estimée selon le rapport de l'absorbance à 280 nm divisée par 1,4. Les

anticorps purifiés ont été conservés à 4°C avec 0,05 % de NaN₃.

2.3. Analyse par cytométrie en flux

La réactivité des anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 a été analysée en cytométrie en flux. Tout d'abord, les cellules CHO-E^k ou CHO-E^p (0,5 à 1 x 10⁶ cellules) ont été centrifugées pendant 5 minutes à 600 x g et le surnageant a été jeté. Ensuite les anticorps biotinilés 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 (1µg/ml) ont été mélangés aux cellules présentes dans des tubes pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées 2 fois dans un tampon PBS pH 7,4 contenant 1 % de BSA (Fisher scientific, Nepean, Ont) et 0,02 % de NaN₃ et centrifugées 5 minutes à 600 x g. La streptavidine-PE (Cederlane, Horby, Ont) dilué 1/1 000 a été ajoutée aux cellules et incubée 30 minutes à 4°C à la noirceur. Les cellules ont été lavées de nouveau et suspendues dans 500 µl de tampon de lavage PBS pH 7,4 afin d'être analysées en cytométrie en flux.

2.4. Marquage à la biotine

La méthode décrite par Guesdon et collaborateurs (Guesdon *et al.*, 1979) a été utilisée pour le couplage de la biotine aux anticorps. Brièvement, l'anticorps, préalablement purifié par chromatographie d'affinité (section 2.2), a été dialysé contre un tampon PBS pH 7,4 et ajusté à une concentration de 1 mg/ml. L'anticorps a ensuite été ajouté à une solution fraîchement préparée de 1 mg/ml de N-hydroxysuccinimidobiotine (NHS ; Sigma) dissout dans le diméthylformamide. Un rapport de 1 mg d'anticorps pour 0,4 mg de NHS a été utilisé pour cette expérience. Le mélange a été incubé pendant 4 heures à température de la pièce avec une légère agitation. La biotine libre a été ensuite éliminée par dialyse contre un tampon PBS pH 7,4 et, des aliquotes d'anticorps biotinilés ont été conservées à -20°C.

3. PURIFICATION DE COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II

3.1. Préparation de l'immunoabsorbant

Les anticorps 14.4.4s et 17.3.3s ont été utilisés pour la chromatographie d'immunoaffinité. Ces anticorps purifiés (section 2.2) ont été préalablement dialysés contre un tampon de couplage (0.1 M NaHCO₃ pH 8,5, 0,5M NaCl). Ensuite, 15 mg d'anticorps ont été couplés à 1 g de gel Sepharose 4B activé au bromure de cyanogène (CNBr) (Amersham Pharmacia biotech.). Le gel a d'abord été gonflé dans une solution 1 mM HCl, puis les anticorps purifiés et dialysés contre le tampon de couplage, ont été ajoutés à ce dernier. Suite à une incubation de 16 heures à 4°C avec agitation par rotation inverse ou jusqu'à ce que la D.O. à 280 soit minimale, les groupements réactifs résiduels ont été bloqués par une seconde incubation de 16 h à 4°C dans un tampon 0,2 M glycine pH 8,0. Finalement, le gel a été lavé en trois cycles successifs dans un tampon acétate (0,1 M acétate de sodium pH 4,0, 0,5 M NaCl) et un tampon bicarbonate (0.1 M NaHCO₃ pH 8,5, 0,5M NaCl). Le gel a été conservé à 4°C dans le tampon bicarbonate avec 0,05 % de NaN₃. Les gels de sépharose 4B activés au CNBr et couplés aux anticorps 14.4.4s et 17-3-3s seront donc nommé 14.4.4s-sépharose et 17.3.3s-sépharose tout au long de ce mémoire.

3.2. Solubilisation de l'antigène

Les cellules CH27mHEL-Hb et CH27-E^P/EPM ont été centrifugées à 600 x g pendant 15 minutes puis lavées 2 fois dans un tampon PBS pH 7,4. Les cellules ont ensuite été solubilisées dans un tampon PBS pH 7,4 contenant 10 mM d'iodoacetamine (Sigma), 1 mM de PMSF (Sigma), 20 µg/ml de leupeptine (Sigma) et 40 mM de détergents octanoyl-N-methylglucamide (MEGA-8) et nonaoyl-N-methylglucamide (MEGA-9) (Sigma) à une concentration de 5 x 10⁸ cellules par ml pendant une heure à 4°C sur un agitateur rotatif. Le lysat cellulaire a été centrifugé à 10 000 x g pendant 40 minutes à 4°C. Le surnageant (antigène) a finalement été conservé à 4°C.

3.3. Purification des complexes I-E^k et I-E^P

L'antigène solubilisé a été ajouté à un volume de 3,5 ml d'immunoabsorbant et incubé 16 heures à 4°C sur un agitateur rotatif. Le gel a ensuite été versé dans une colonne à chromatographie d'un diamètre de 1 cm. Le gel a été lavé avec un tampon PBS pH 7,4 contenant 20 mM de MEGA-8 et MEGA-9 à un débit de 0,2 ml/minute jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm des fractions de lavages soit minimale. Les protéines adsorbées ont été éluées à un débit de 1ml/minute. Les complexes I-E^k/peptides ont été élués dans un tampon 0,05 M diéthylamine pH 10,5 (Sigma), contenant 0,15 M de NaCl, 20 mM de MEGA-8 et 20 mM de MEGA-9 alors que les complexes I-E^P/peptides ont été élués dans un tampon 0,1 M Tris pH 10,5 contenant également 0,15 M de NaCl et 20 mM de MEGA-8 et de MEGA-9. Des fractions de 1 ml ont été recueillies et elles ont été neutralisées par l'ajout immédiat de 0,1 volume de tampon 1,0 M Tris-HCl pH 6,5. La D.O. à 280 nm a ensuite été prise pour chacune de ces fractions. La colonne a été régénérée en passant le tampon d'éluion jusqu'à ce que la D.O soit minimale puis, elle a été lavée avec le tampon de lavage PBS pH 7,4. Les fractions ayant une densité optique supérieure à 0,2 à 280 nm ont été regroupées et conservées à 4°C. La concentration en protéine, en mg/ml, a été estimée selon le rapport de l'absorbance à 280nm divisée 1,5.

4. IMMUNOPRÉCIPITATIONS

Afin d'effectuer les immunoprécipitations, les complexes du CMH de classe II I-E^P et I-E^k ont été récupérés à partir des cellules CH27mHEL-Hb et CH27-E^P/EPM suite à une étape de solubilisation décrite à la section 3.2. De plus, les anticorps 14.4.4s et 17.3.3s ont préalablement été couplés à la résine de sépharose 4B activé au CNBr décrit à la section 3.1 (14.4.4s-sépharose et 17.3.3s-sépharose). Tout d'abord, un volume de 50 µl de lysat cellulaire provenant d'environ $1,25 \times 10^7$ cellules totales, a été adsorbé à 10 µl de billes de sépharose 4B activé au CNBr préalablement couplées à un anticorps, pendant 16 h à 4°C avec une légère agitation par rotation inverse. Les billes de sépharose ont ensuite été centrifugées légèrement afin de vidanger le surnageant et ont été lavées 4 fois dans un tampon PBS pH 7,4 contenant 20mM de MEGA-8 et 20 mM de MEGA-9.

4.1. Analyse de la stabilité des complexes du CMH de classe II

Suite à l'étape d'immunoprécipitation, les différents échantillons ont été incubés dans 10 µl de tampon PBS pH 7,4 (témoin) ou dans différents tampons d'élutions (0,01 M citrate-phosphate pH 10,5, 0,01 M phosphate pH 4,0, 0,01 M Tris pH 10,5, 0,01 M bicarbonate pH 10,5, 0,01 M borax, pH 10,5, 0,01 M glycine pH 10,5 et 0,05 M diéthylamine pH 10,5), tous contenant 0,15 M NaCl et 20 mM de MEGA-8 et MEGA-9, pendant 30 minutes à la température de la pièce. Ils ont ensuite été dilués 1/2 dans le tampon d'échantillon (section 5.3) et chargés directement (avec les billes de sépharose) sur un gel de polyacrylamide, afin d'être analysés par immunoempreinte de type « Western » (section 5.4).

4.2. Optimisation de la méthode d'élution des complexes du CMH de classe II

Suite à l'étape d'immunoprécipitation, les différents échantillons ont été incubés dans 10 µl de différents tampons d'élution (0,05 M diéthylamine pH 10,5, 0,01 M Tris pH 10,5 et 0,01 M phosphate pH 4,0 tous contenant 0,15 M NaCl et 20 mM de MEGA-8 et MEGA-9) pendant 30 minutes à la température ambiante. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés légèrement afin de récupérer le surnageant contenant l'éluat. Le culot contenant les billes de sépharose 4B activé au CNBr et couplées à un anticorps ont été diluées avec 10 µl de tampon PBS pH 7,4. Finalement, l'éluat et les billes de sépharose ont été dilués 1/2 dans le tampon d'échantillon (section 5.3) et chargés sur un gel de polyacrylamide afin d'être analysés par immunoempreinte de type « Western » (section 5.4)

5. TESTS DE STABILITÉ DES COMPLEXES

5.1. Test ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés par une approche de capture d'antigène. Brièvement, 100 µl d'une préparation d'anticorps 14.4.4s (anti-chaîne α) diluée à une concentration de 1 µg/ml dans un tampon carbonate 0,1 M pH 9,5 a été ajoutée aux puits d'un plateau 96 puits NUNC-immunoplate maxisorp (VWR, Mississauga, Ont.) à 4°C pendant 16 heures. Les plateaux ont été scellés pour toutes les étapes d'incubations

durant ce test. Les puits ont ensuite été vidés et lavés 3 fois avec environ 300 µl par puits de tampon PBS pH 7,4 contenant 0,05 % (v/v) de Tween 20 (Sigma). Les puits ont été bloqués par l'ajout de 200 µl par puits de tampon PBS pH 7,4 contenant 0,1 % (v/v) de Tween-20 et 10 % de SBV (diluant ELISA), pendant 1 heure à la température de la pièce. Les plateaux ont été lavés de nouveau et incubés 2 heures à température ambiante suite à l'ajout de 100 µl d'antigène dilué 1/1000 et 1/10 000 dans le diluant ELISA. Les échantillons ont préalablement été chauffés à 100°C pendant 2, 5 et 10 minutes. Les plateaux ont été lavés 5 fois et 100 µl par puits d'une dilution contenant 1µg/ml d'anticorps 17-3-3s (anti-chaîne β de I-E^k) biotinilé a été ajouté conjointement à 100 µl d'une dilution 1/1 000 de SA-HRP (Zymed Laboratories, San Francisco, CA). Suite à une incubation de 1 heure à la température de la pièce, les plateaux ont été lavés 7 fois et séchés. Une quantité de 100 µl de substrat chromogène TMB (Amersham Pharmacia Biotech.) a été ajouté à chacun des puits et les plateaux ont été incubés 30 minutes à la température ambiante dans la noirceur. La réaction a ensuite été arrêtée par l'ajout de 50 µl par puits de solution d'arrêt 2 N H₂SO₄ et la lecture à 450 nm s'est effectuée dans les 30 minutes suivant l'arrêt de la réaction.

5.2. Immunoempreinte ponctuelle

5.2.1. Méthode par capture d'antigène

Une membrane de nitrocellulose Hybond-C extra (Bio-Rad, Mississauga, Ont) a préalablement été trempée dans 20 ml de tampon PBS pH 7,4 pendant 10 minutes, puis déposée sur l'appareil Bio-DOT (Bio-Rad). Ensuite, 100 µl d'une dilution contenant 1 µg/ml d'anticorps 14-4-4s (anti-chaîne α) dans un tampon PBS pH 7,4 a été adsorbé à chacun des puits pendant environ 5 secondes sous vide. La membrane de nitrocellulose a été bloquée par l'ajout d'environ 200 µl par puits de PBS pH 7,4 contenant 5 % de lait écrémé pendant 1 heure à la température ambiante avec une légère agitation. Les puits ont ensuite été vidés par inversion et 100 µl des différentes dilutions d'antigène dans le tampon de blocage ont été ajoutés à chacun des puits. Suite à une incubation de 2 heures à la température ambiante, la membrane de nitrocellulose a été retirée de l'appareil Bio-Dot et un lavage de 15 minutes suivi de 2 lavages de 5 minutes ont été réalisés dans un tampon PBS pH 7,4. La membrane de nitrocellulose a ensuite été déposée dans 10 ml de tampon de blocage contenant 1 µg/ml une dilution d'anticorps anti-chaîne β (17.3.3s ou

2B6.B8) biotinilés ainsi qu'une dilution 1/1 000 de SA-HRP, pendant 1 heure à la température de la pièce avec agitation. La membrane de nitrocellulose a été lavée de nouveau et a été recouverte, pendant 1 minute à la température de la pièce, du mélange des deux réactifs qui ont été fournis avec la trousse de détection en chemiluminescence ECL de la compagnie Amersham Pharmacia Biotech. La membrane de nitrocellulose a finalement été placée dans une pellicule de plastique et insérée dans une cassette d'exposition, dans laquelle un film Kodak a été exposé pour des durées variables (quelques secondes à quelques minutes).

5.2.2. Méthode directe

La membrane de nitrocellulose a préalablement été trempée dans 20 ml de tampon PBS pH 7,4 pendant 10 minutes, puis déposée sur l'appareil Bio-DOT. Ensuite, 100 µl par puits de différentes dilutions d'antigène dans un tampon PBS pH 7,4 ont été adsorbés sous vide pendant 5 secondes. La membrane de nitrocellulose a été retirée de l'appareil et a été bloquée dans 20 ml de PBS pH 7,4 contenant 5 % de lait écrémé, pendant 1 heure à la température ambiante avec une légère agitation. Ensuite, la membrane de nitrocellulose a été déposée dans 10 ml de tampon de blocage contenant 1 µg/ml d'une dilution d'anticorps biotinilés anti-chaîne α (14.4.4s) ou anti-chaîne β (17.3.3s ou 2B6.B8) pendant 1 heure à la température de la pièce avec agitation. La membrane a été lavée dans un tampon PBS pH 7,4, une fois 15 minutes suivi de 2 fois 5 minutes, puis déposée dans 10 ml de tampon de blocage contenant une dilution 1/1 000 de SA-HRP pendant 1 heure à température ambiante avec agitation. La membrane a été lavée de nouveau et révélée par chemiluminescence (ECL) comme dans la section précédente.

5.3. **Electrophorèse de protéines (SDS-PAGE)**

Les gels de polyacrylamide ont été préparés selon le protocole et l'appareil du système « Mini-Protean II » de Bio-Rad (Laemmli, 1970). Brièvement, un gel de séparation (12 % (p/v) acrylamide/Bis (37,5/1); 0,38 M Tris-HCL pH 8,8 ; 0,1 % (p/v) SDS ; 0,05% (p/v) persulfate d'ammonium ; 0,05 % (v/v) TEMED) précédé d'un gel de regroupement (4 % (p/v) acrylamide/Bis (37,5/1) ; 0,125 M Tris-HCL pH 6,8 ; 0,1 % (p/v) SDS ; 0,05% (p/v) persulfate d'ammonium ; 0,01 % (v/v) TEMED) ont été polymérisés. Les échantillons ont été dilués 1/2 dans un tampon d'échantillon (100 mM Tris-HCL pH 6,8 ; 2 % SDS ; 20 % glycérol et 0,006 % de bromophénol blue) en absence

ou en présence de conditions réductrices (2 % β -mercaptoéthanol) et incubés à la température de la pièce ou à 100°C pendant 5 minutes. Ils ont ensuite été chargés sur le gel de polyacrylamide avec un standard de faibles masses moléculaires (Bio-Rad). La migration a été réalisée à 200 volt pendant 45 minutes dans un tampon de migration pH 8,3 contenant 120 mM de Tris, 960 mM de glycine et 0,5 % (p/v) de SDS.

5.3.1. Coloration des protéines

Les gels de polyacrylamide ont été colorés pendant une heure dans une solution de bleu de Coomassie G-250 (0,1 %) contenant 40 % (v/v) de méthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique glacial. Une solution de décoloration (50 % (v/v) méthanol, 10 % (v/v) acide acétique) a été utilisée afin de permettre la visualisation des protéines.

5.4. Immunoempreinte de type « Western »

Le transfert de protéines sur membranes de nitrocellulose a été réalisé suite à la séparation des protéines par électrophorèse. Les protéines ont été transférées du gel à la membrane de nitrocellulose Hybond-C extra dans un appareil « mini Trans-BLOT cell » de Bio-Rad pendant 1 heure à 100 volts dans le tampon de transfert contenant 48 mM de Tris, 39 mM de glycine, 0,037 % (v/v) de SDS et 20 % (v/v) de méthanol. La membrane de nitrocellulose a ensuite été agitée légèrement pendant une heure à la température de la pièce dans une solution de blocage composée de 5 % de lait écrémé dans du PBS pH 7,4. La membrane de nitrocellulose a ensuite été déposée dans le tampon de blocage contenant 1 μ g/ml d'une dilution d'anticorps biotinilés pendant une heure sur une plaque agitatrice à la température de la pièce. Un lavage de 15 minutes suivit de deux lavages de 5 minutes dans un tampon PBS pH 7,4 ont été effectués et la membrane de nitrocellulose a été déposée dans le tampon de blocage contenant une dilution 1/1 000 de SA-HRP. Après une heure d'agitation à la température ambiante, la membrane de nitrocellulose a été lavée de nouveau et révélée par chemiluminescence (section 4.2.1.)

6. PURIFICATION DE COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II À PARTIR DE SPLÉNOCYTES DE SOURIS

6.1. Récupération des cellules de la rate

Les souris B6.AKR (H-2^k) et B10.P (H-2^p) ont été sacrifiées par asphyxie au CO₂. La rate de chacune des souris a été récupérée et déposée dans un volume de 10 ml de HBSS (Gibco BRL). Les rates des souris ont ensuite été broyées à l'aide de lamelles givrées et les cellules ont été récupérées dans un milieu frais. Les splénocytes ont enfin été lavés 3 fois dans le milieu HBSS froid et centrifugés à 6 000 x g pendant 5 minutes. Un compte cellulaire a été effectué et les splénocytes ont été solubilisés comme dans la section 3.2. Les échantillons ont ensuite été immunoprécipités (sections 4. et 4.1.) et analysés par immunoempreinte de type « Western » (section 5.4). Les souris proviennent à l'origine du laboratoire du Dr. Paul Allen (Washington University, St-Louis, MO) et ont été maintenues en colonies au centre de biologie expérimentale.

7. TEST D'ACTIVATION D'HYBRIDOMES

Les tests d'activation d'hybridomes ont été réalisés à partir de complexes I-E^k et I-E^p purifiés des cellules CH27mHEL-Hb et CH27-E^p/EPM. Premièrement, 50 µl de complexes purifiés provenant d'environ 1,25 x 10⁶ cellules, ont été déposés dans les puits d'un plateau 96 puits (en triplicata) et dilués en série de facteur 2. Les puits ont ensuite été complétés à 300 µl avec du RPMI 1640, les plateaux ont été scellés et incubés 16 heures à la température de la pièce. Les puits des plateaux ont été lavés 3 fois avec un milieu frais. Afin d'obtenir un témoin supplémentaire, différentes dilutions de cellules CH27-E^p/EPM et CH27mHEL/Hb ont été ajoutées aux puits sélectionnés. Ensuite, 50 µl par puits (5 x 10⁴ cellules/ml) de l'hybridome T ont été ajoutés et incubés 24 heures à 37°C. De plus, afin de vérifier la spécificité des réactions, 50 µl (1 µg/ml) d'un anticorps 14.4.4s ou 2B6.B8 ont été ajoutés aux puits sélectionnés, avant l'ajout de l'hybridome T. Un volume de 100 µl d'échantillon (surnageant) a ensuite été transféré dans de nouveaux puits et les plateaux ont été congelés à -20°C pendant 16 heures afin de lyser les cellules qui auraient pu être transférées. La lignée cellulaire CTLL-2 (cellules dépendantes de l'IL-2 pour sa croissance) a été utilisée afin d'évaluer l'activation des hybridomes T 2.102 par la production d'IL-2. Les cellules CTLL-2 ont d'abord été lavées 3 fois avec 12 ml

de HBSS. Les CTLL-2 ont ensuite été suspendues à une concentration de 5×10^4 cellules/ml dans un milieu de croissance composé de RPMI-1640 supplémenté de 10 % (v/v) de SVB, 2 mM de Glutamax et de 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine. Une quantité de 100 μl de cette suspension a ensuite été ajoutée à tous les surnageants prélevés précédemment et les plateaux ont été incubés 16 heures à 37°C. Une quantité de 20 μl par puits (0.4 μCi) de thymidine marquée radioactivement (^3H Thymine) (ICN, Aurora, Ont.) a été ajoutée aux puits des plateaux. Après une incubation de 24 heures à 37°C, les plaques ont été déposées dans l'appareil « Micro cell harvester » pour récupérer l'ADN radiomarqués sur un filtre de fibre de verre et l'incorporation de la thymidine dans les cellules a été déterminée à l'aide de l'appareil 1450 MicroBeta Trilux et du logiciel MicroBeta Windows Workstation, tous deux de Wallac (Boston, Ma). Pour le témoin positif, 100 μl d'IL-2 (5 $\mu\text{g/ml}$) a été ajouté alors que pour le témoin négatif, seulement le milieu de croissance des CTLL-2 a été ajouté.

RÉSULTATS

1. Caractérisation des anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8.

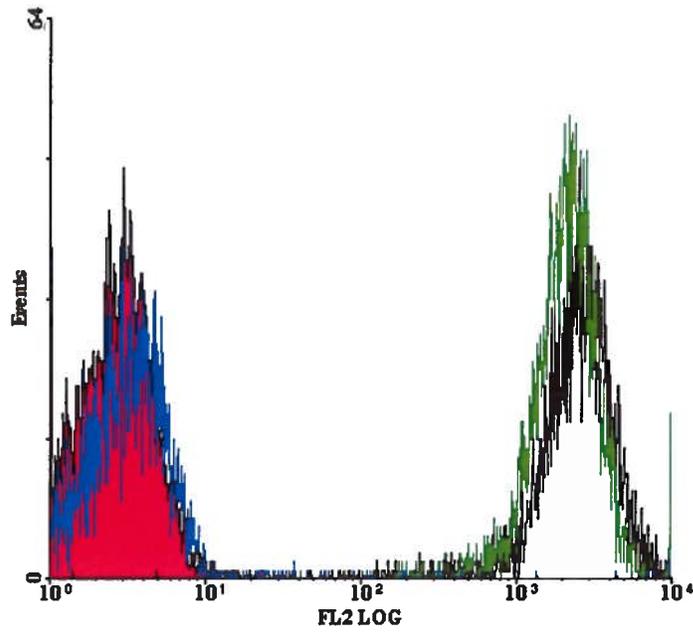
La production des anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 a été nécessaire afin de pouvoir les utiliser lors de la purification des complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^p. Les anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur une résine de protéine G-Sepharose 4 fast-flow. Toutefois, pour s'assurer de la pureté et de la spécificité de ces anticorps, nous avons effectué des analyses en SDS-PAGE, en cytométrie en flux, et par immunoempreinte ponctuelle.

Afin de vérifier la spécificité des anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8, nous avons effectué une analyse en cytométrie en flux en utilisant les cellules CHO-E^k ou CHO-E^p. La Figure 4A et B montre tout d'abord la spécificité de l'anticorps 14.4.4s (noir). Cet anticorps reconnaît les molécules I-E^k et I-E^p puisqu'il est spécifique pour la chaîne α de I-E (non-polymorphique) (Ozato *et al.*, 1980). Toutefois, tel qu'attendu, l'anticorps 17.3.3s (vert) ne réagit pas avec la molécule du CMH de classe II I-E^p puisqu'il est spécifique pour la chaîne β de I-E^k (Figure 4B) (Ozato *et al.*, 1980). De plus, l'anticorps 2B6.B8 (bleu) ne marque pas les cellules CHO-E^k exprimant les molécules du CMH de classe II I-E^k puisque ce dernier est spécifique pour la chaîne β de I-E^p (Figure 4A) (Daniel *et al.*, 1998b). Il a également été démontré que les anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 ne réagissaient pas contre les cellules CHO non transfectées, confirmant ainsi leur spécificité pour les molécules du CMH de class II (Daniel *et al.*, 1998b). Bref, l'anticorps 14.4.4s reconnaît les chaînes α des molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^p alors que les anticorps 17.3.3s et 2B6.B8 réagissent avec les chaînes β de I-E^k ou de I-E^p.

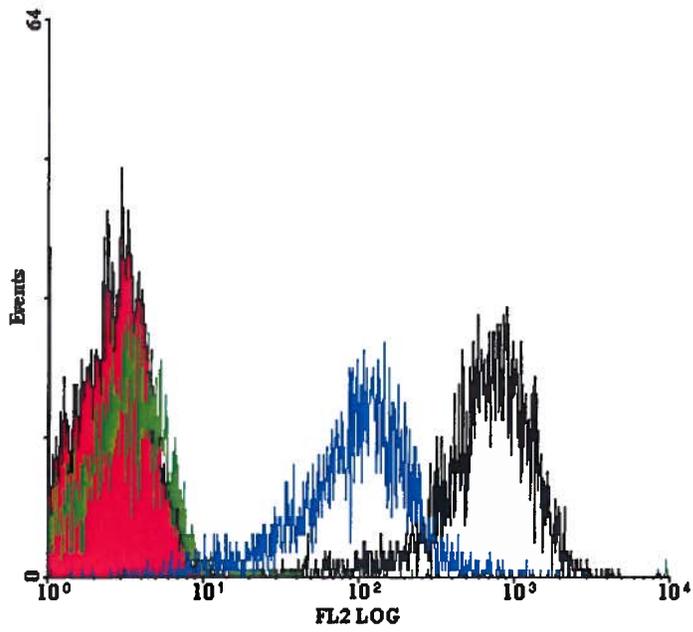
Puisque la stabilité des complexes du CMH de classe II I-E^p et I-E^k a été vérifiée par des analyses en immunoempreinte ponctuelle et en immunoempreinte de type « Western », la spécificité des anticorps anti-classe II a également été vérifiée dans des conditions semblables. La Figure 5 montre les résultats de l'analyse de la spécificité des anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 par immunoempreinte ponctuelle. Les cellules

Figure 4 : Spécificité des anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 par analyse en cytométrie en flux. La réactivité des anticorps 14.4.4s (noir), 17.3.3s (vert) et 2B6.B8 (bleu) a été analysée en cytométrie en flux en utilisant les cellules CHO-E^k **A**) ou CHO-E^p **B**). Les cellules ont été lavées et un anticorps biotinilés 14.4.4s, 17.3.3s ou 2B6.B8 (1µg/ml) a été ajouté pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées et incubées avec la streptavidine-PE dilué 1/ 1000 pendant 30 minutes à 4°C et à la noirceur. Finalement, les cellules ont été lavées de nouveau et analysées en cytométrie en flux.

A)

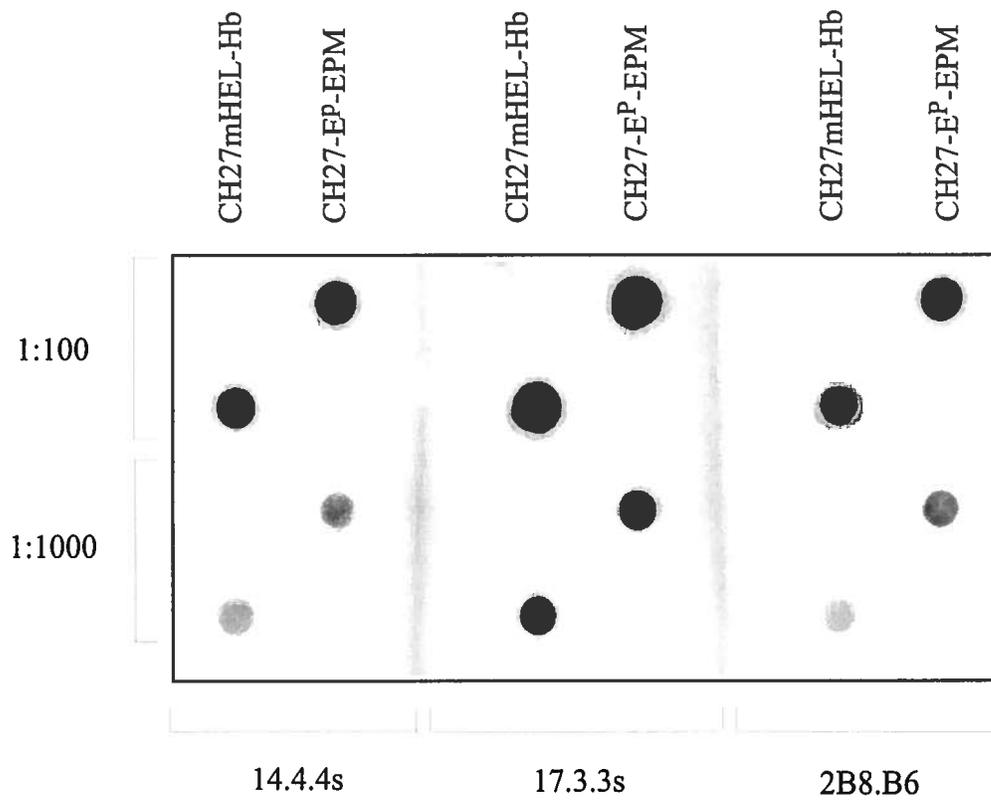


B)



- Cellules non marquées
- 17.3.3s
- 2B6.B8
- 14.4.4s

Figure 5: Spécificité des anticorps 14.4.4s, 17.3.3s et 2B6.B8 par immunoempreinte ponctuelle. Les cellules CH27-E^p-EPM et CH27mHEL-Hb ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 (octanoyl-N-méthylglucamide) et MEGA-9 (nonanoyl-N-méthylglucamide) ainsi que des inhibiteurs de protéases. Le lysat cellulaire contenant les molécules du CMH de classe II a ensuite été adsorbé sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil DOT BLOT, à différentes dilutions, soit 1/ 100 et 1/ 1000. La membrane de nitrocellulose a été bloquée et un anticorps (biotinilé) anti-chaîne α ou β a été ajouté. La streptavidine-HRP a ensuite été ajoutée et la réaction a été révélée par chimoluminescence (ECL).



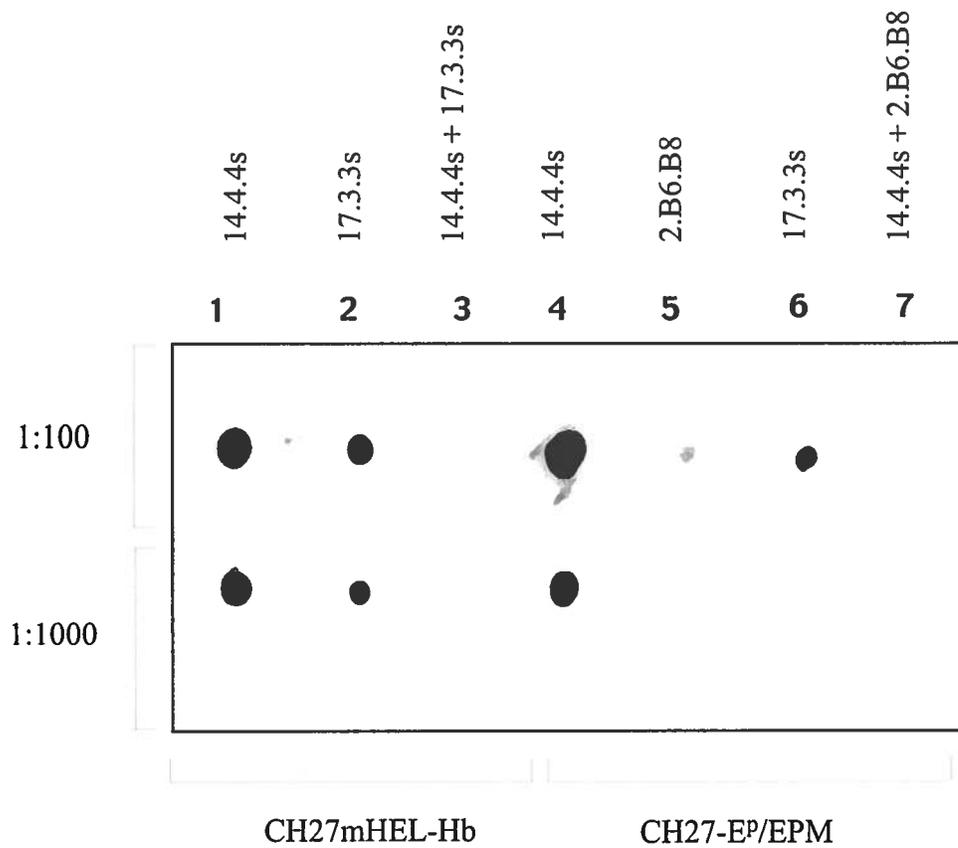
utilisées pour cette expérience, les CH27mHEL-Hb, sont des lymphomes de cellules B d'haplotype H-2^k, exprimant donc la région du CMH de classe II I-E^k et qui expriment également de façon constitutive une densité élevée de complexes du CMH de classe II I-E^k/Hb(64-76), suite à leur transfection avec un ADN recombinant. Les cellules CH27-E^P/EPM ont été transfectées avec la chaîne β de la molécule du CMH de classe II I-E^P ainsi qu'avec une construction permettant l'expression constitutive de l'allomimotope EPM. En plus d'exprimer des complexes I-E^P/EPM, elles expriment également des complexes du CMH de classe II I-E^k. Les résultats présentés à la Figure 5 démontrent que les anticorps 14.4.4s et 17.3.3s réagissent contre les deux lignées cellulaires, ce qui est attendu puisque ces lignées cellulaires expriment chacune des molécules du CMH de classe II I-E^k. Toutefois, l'anticorps 2B6.B8 semble également réagir contre les deux lignées cellulaires, même si les cellules CH27mHEL-Hb n'expriment pas de molécules du CMH de classe II I-E^P. Il y a donc réactivité croisée de l'anticorps 2B6.B8 puisqu'il réagit contre les chaînes β des molécules du CMH de classe II I-E^P et I-E^k. L'anticorps 2B6.B8 n'a donc pas été utilisé pour la purification des molécules du CMH de classe II I-E^P dû à sa réactivité croisée en analyse par immunoempreinte ponctuelle.

2. DÉTERMINATION D'UNE MÉTHODE DE DÉTECTION DES COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II STABLES.

2.1. Immunoempreinte ponctuelle

Afin d'évaluer la stabilité des complexes CMH/peptides purifiés, trois techniques ont été comparées. Dans cette étude, les cellules témoins CH27mHEL-Hb ont été choisies car elles ont été fortement utilisées pour la purification de complexes du CMH de classe II puisque les molécules I-E^k sont reconnues pour être stables dans des conditions standard de purification (Carrasco-Marín *et al.*, 1996; Luescher et Unanue, 1990; Schafer *et al.*, 1998). L'utilisation de ces cellules est également avantageuse puisqu'elles expriment un épitope déjà caractérisé (Vidal *et al.*, 2000). La première technique, par immunoempreinte ponctuelle (Figure 6), permet, par méthode directe, de détecter les chaînes α et β des différents complexes. Effectivement, les chaînes α et β des molécules du CMH de classe II I-E^k provenant du lysat des cellules témoins ont été détectées dans

Figure 6 : **Détection de complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^p stables par immunoempreinte ponctuelle.** Les cellules CH27mHEL-Hb et CH27-E^p/EPM ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 ainsi que des inhibiteurs de protéases. La détection des chaînes α et β des molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^p a été réalisée par une méthode directe et la détection de complexes du CMH de classe II stables a été effectuée par capture d'antigène comme décrit dans la section approche expérimentale. Le lysat cellulaire contenant les molécules du CMH de classe II a été adsorbé sur une membrane de nitrocellulose à différentes dilutions, soit 1/ 100 et 1/ 1000. La réaction a été révélée par chimoluminescence (ECL).



Puits 1,2,4,5 et 6: méthode directe.

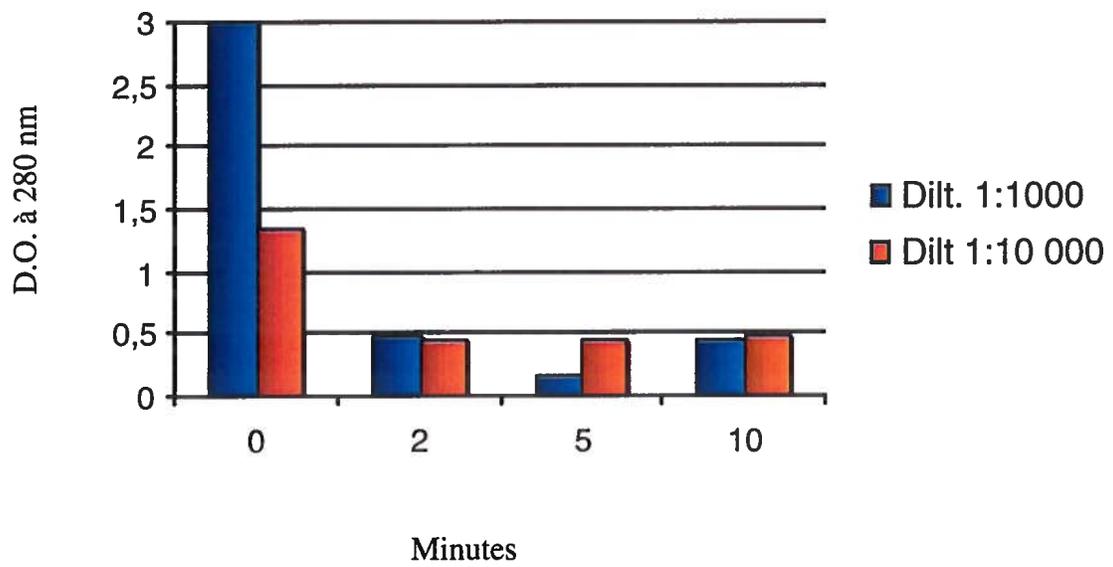
Puits 3 et 7: méthode par capture d'antigène.

les puits 1 et 2 alors que les chaînes α et β des molécules du CMH de classe II I-E^k et les chaînes β de I-E^p provenant du lysat des cellules CH27-E^p/EPM ont été détectées dans les puits 4, 5 et 6. Par contre, la méthode directe permet uniquement la détection des différentes chaînes α et β des complexes du CMH de classe II I-E^p et I-E^k. Cette méthode ne permet donc pas d'estimer la stabilité des complexes CMH/peptides présent dans le lysat des cellules témoins. Nous avons donc sélectionné la méthode par capture d'antigènes pour la détection de complexes CMH/peptides stables (puits 3 et 7). Malheureusement, les résultats démontrent clairement que cette approche ne permet pas de révéler des complexes I-E^k/peptides stables présent dans le lysat des cellules CH27mHEL-Hb. De plus, la spécificité croisée de l'anticorps 2B6.B8 ne permet toujours pas de s'assurer qu'il n'y a pas eu contamination par des complexes I-E^k/peptides dans l'échantillon contenant des complexes I-E^p/peptides provenant des cellules CH27-E^p/EPM (puits 7). Devant l'inefficacité de la technique d'immunoempreinte ponctuelle à détecter des complexes CMH/peptides stables, nous avons dû évaluer une seconde méthode, soit l'ELISA.

2.2. ELISA

La détection de molécules du CMH de classe II I-E^k stables par ELISA a été effectuée par une méthode de capture d'antigènes, à l'aide d'un anticorps anti-chaîne α de I-E et d'un anticorps anti-chaîne β de I-E^k (Figure 7). De plus, l'antigène provenant du lysat de cellules CH27mHEL-Hb, a été préalablement chauffé durant 2, 5 et 10 minutes afin de s'assurer de la spécificité de la réaction. Effectivement, le chauffage des molécules du CMH de classe II pendant un temps déterminé, déstabilise les molécules qui se dissocient en chaînes α et β libres (Schafer *et al.*, 1998). Les chaînes α et β dissociées ne sont donc plus détectables par ELISA puisque des anticorps ayant une spécificité différentes, soit un anti-chaîne α de I-E et un anti-chaîne β de I-E^k, ont été utilisés. La Figure 7 montre tout d'abord la présence de molécules du CMH de classe II I-E^k stable pour différentes dilutions d'antigènes lorsque les molécules ne sont pas chauffées. Cette technique a donc permis de quantifier les hétérodimères $\alpha\beta$ stables. Par contre, suite à un chauffage de plus de 2 minutes, les chaînes α et β sont complètement dissociées, empêchant ainsi la détection de complexes CMH/peptides stables. Même si cette méthode permet la détection d'hétérodimères $\alpha\beta$ stables, elle n'a pas été sélectionnée puisque l'anticorps 2B6.B8, spécifique aux chaînes β de I-E^p, possède également une réactivité croisée avec

Figure 9 : Détection de complexes du CMH de classe II I-E^k stables par ELISA. L'ELISA a été réalisé par une approche de capture d'antigènes. Un anticorps purifié 14.4.4s (1 µg/ml) a d'abord été adsorbé dans chacun des puits d'un plateau 96 puits. Ensuite, l'antigène contenant les complexes du CMH de classe II I-E^k a été ajouté à différentes dilutions (1/ 1000 et 1/ 10 000). L'antigène a préalablement été incubé à 100⁰ C pendant 2, 5 et 10 minutes. Puis, un deuxième anticorps biotinilé 17.3.3s (1 µg/ml) a été ajouté aux échantillons non-chauffés et chauffés, conjointement à une dilution 1/1000 de streptavidine-HRP. La réaction a finalement été révélée par l'ajout d'un mélange substrat/chromogène et mesurée par spectrophotométrie à 450nm.

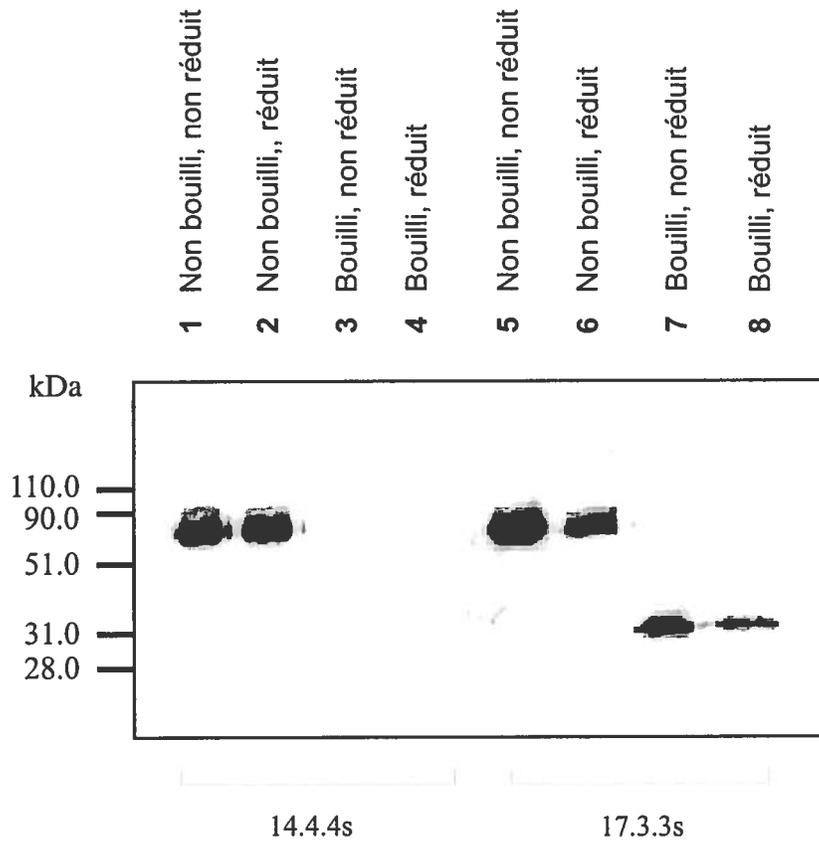


les chaînes β de I-E^k, ne permettant donc pas d'identifier et de quantifier les molécules du CMH de classe II I-E^P. Comme cette méthode n'était pas adéquate pour la détection de molécules du CMH de classe II I-E^P stables, une troisième technique, soit celle de l'immunoempreinte de type « Western », a été évaluée.

2.3. Immunoempreinte de type « Western »

Nous avons donc ensuite évalué la méthode par immunoempreinte de type « Western ». Cette technique innovatrice a été utilisée précédemment par l'équipe de Pierce (Schafer *et al.*, 1998) en utilisant les anticorps 17.3.3s et Y-17 (Lerner *et al.*, 1980) pour la détection de complexes du CMH de classe II I-E^k. Les résultats ont démontré que l'anticorps 17.3.3s pouvait non seulement détecter des hétérodimères $\alpha\beta$ stables, mais également des chaînes β dissociées. Nous avons ainsi utilisé une technique semblable dans laquelle l'anticorps 14.4.4s a également été testé. Les molécules du CMH de classe II stables migrent généralement sous une forme compacte formée d'un trimère ayant une masse moléculaire d'environ 52 à 56 kDa. Lorsque les complexes deviennent instables par chauffage ou par l'ajout de substances dénaturantes, les composantes des complexes migrent sous une forme dissociée, c'est-à-dire en chaînes α et β libres à environ 30 kDa (Schafer *et al.*, 1998; Weenink et Gautam, 1997). La Figure 8 montre la présence de molécules du CMH de classe II I-E^k stables (\approx 55 kDa), purifiées à partir des cellules CH27-E^P/EPM, dans les puits 1, 2, 5 et 6, c'est-à-dire dans des conditions non-bouillies, et en présence ou en absence de conditions réductrices. Toutefois, lorsque les molécules du CMH de classe II I-E^k sont chauffées à 100°C, il devient impossible de déceler la présence de chaînes α dissociées avec l'anticorps 14.4.4s. Cependant, nous avons observé la présence de chaînes β dissociées avec l'anticorps 17.3.3s, ce qui confirme finalement la présence de molécules du CMH de classe II stables lorsqu'elles ne sont pas chauffées. Cette technique toute simple a donc été choisie pour détecter la présence de molécules I-E^P stables. Par contre, il a été nécessaire d'établir un protocole permettant la séparation des complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^P présents à la surface des cellules CH27-E^P/EPM.

Figure 8 : Détection de complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^p stables par immunoempreinte de type « Western ». Les cellules CH27-E^p/EPM (2.0 x 10⁹ cellules) ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 et des inhibiteurs de protéases. Les complexes du CMH de classe II I-E^k ont été purifiés du lysat cellulaire par chromatographie d'affinité sur une résine 14.4s-sépharose. Les molécules du CMH de classe II I-E^k ont été éluées dans le tampon d'éluion 0,05 M diéthylamine (pH 10,5). Les complexes du CMH de classe II purifiés ont ensuite été analysés par immunoempreinte de type "Western". Brièvement, un gel de séparation 12 % précédé d'un gel de regroupement 4 % ont été polymérisés. Les échantillons ont été dilués 1/2 dans un tampon d'échantillon en absence ou en présence de conditions réductrices et incubés à la température de la pièce ou à 100°C pendant 5 minutes. Ils ont ensuite été chargés sur le gel de polyacrylamide avec un standard de faible masse moléculaire. Le gel de polyacrylamide a été transféré sur une membrane de nitrocellulose qui a ensuite été bloquée et incubée avec un anticorps biotinilé anti-classe II (1 µg/ml). La membrane de nitrocellulose a finalement été lavée, incubé dans une dilution 1/1000 de streptavidine-HRP et révélée par chimoluminescence (ECL).

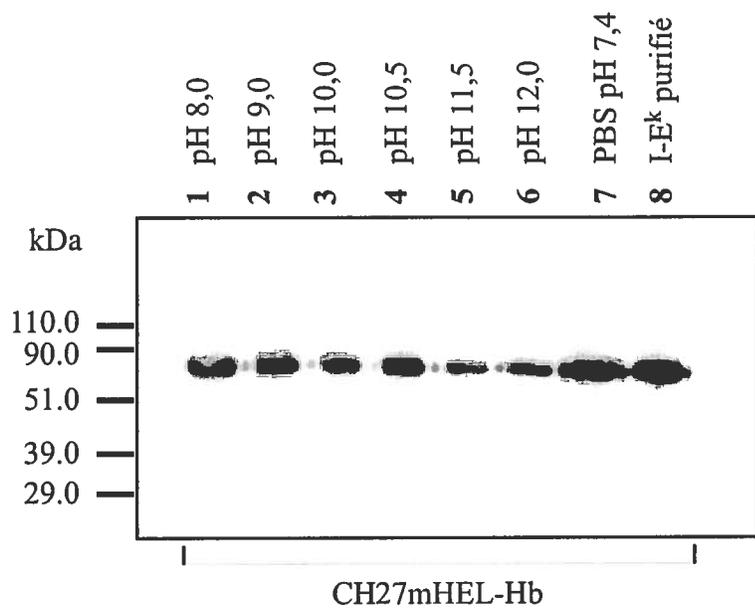


3. ANALYSE DE LA STABILITÉ DES COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II I-E^k et I-E^p.

Les complexes du CMH de classe II sont généralement élués dans des tampons acides ou alcalins (Luescher et Unanue, 1990). Nous avons donc vérifié la stabilité des molécules du CMH de classe II I-E^k provenant des cellules CH27mHEL-Hb dans un tampon diéthylamine ayant un pH variant de 8 à 12, afin de s'assurer de pouvoir récupérer des molécules du CMH de classe II I-E^k purifiées dans des conditions optimales (Figure 9). Nos résultats démontrent que les molécules du CMH de classe II I-E^k semblent stables entre les pH 8,0 et 10,5. Toutefois, lorsque les hétérodimères $\alpha\beta$ sont incubés dans des tampons de pH supérieurs à 10,5, ils semblent moins stables puisque ces derniers sont détectés en plus petite quantité. Les complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^p ont donc été purifiés à l'aide de tampons d'éluion ayant un pH de 10,5.

Il a été essentiel de mettre au point une méthode efficace de séparation des molécules du CMH de classe II I-E^k afin de pouvoir étudier la stabilité des molécules du CMH de classe II I-E^p purifiées à partir des cellules CH27-E^p/EPM. Deux approches avaient donc été sélectionnées pour la purification des molécules du CMH de classe II I-E^p à partir des cellules CH27-E^p/EPM. Dans la première approche, par une méthode directe, les molécules du CMH de classe II seraient purifiées par le passage sur une résine 2B6.B8-sépharose. Dans cette approche, seulement les molécules du CMH de classe II I-E^p seraient retenues et donc purifiées. Il est par contre impossible de s'assurer qu'il n'y a pas de contamination par I-E^k dans l'éluat contenant les molécules du CMH de classe II I-E^p, et ce, dû à la spécificité croisée de l'anticorps 2B6.B8 (Figure 5). Nous avons donc sélectionné la deuxième approche ; la méthode indirecte. Dans cette approche, les complexes du CMH de classe II I-E^k provenant du lysat de cellules CH27-E^p/EPM ont d'abord été retirés par leur passage sur une résine 17.3.3s-sépharose. Puisque l'anticorps 17.3.3s est spécifique pour la chaîne β de I-E^k, seulement les complexes I-E^k/peptide ont été retenus sur la résine 17.3.3s-sépharose. Le filtrat contenant les complexes du CMH de classe II I-E^p non purifiés, a ensuite été passé sur une résine 14.4.4s-sépharose afin de récupérer uniquement les complexes du CMH de classe II I-E^p/peptides purifiés.

Figure 9 : Stabilité des complexes du CMH de classe II I-E^k à différents pH. Les cellules CH27mHEL-Hb (2.0×10^9 cellules) ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 et des inhibiteurs de protéases. Le lysat cellulaire contenant les molécules de classe II I-E^k a ensuite été immunoprécipité en utilisant une résine 14.4.4s-sépharose. Les complexes du CMH de classe II immunoprécipités ont été incubés 30 minutes à différents pH dans le tampon 0,05 M diéthylamine contenant les détergents MEGA-8, MEGA-9 et du NaCl ou dans un tampon PBS pH 7,4. Les complexes du CMH de classe II ont ensuite été analysés par immunoempreinte de type "Western" comme décrit précédemment. Une quantité équivalente de complexes du CMH de classe II a été chargée dans chacun des puits du gel de polyacrylamide.



Suite à l'obtention de complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides par déplétion, nous avons vérifié leur stabilité dans des conditions optimales, en présence du tampon normalement utilisé pour l'élution des molécules du CMH de classe II I-E^k, soit le tampon 0,05 M diéthylamine pH 10,5. La Figure 10 montre clairement l'instabilité des molécules du CMH de classe II I-E^P dans le tampon diéthylamine à pH 10,5 et à pH 8,0 (puits 4 et 5) contrairement aux conditions utilisées pour la solubilisation (PBS pH 7,4). L'instabilité des molécules aux deux pH suggère que ce n'est pas les conditions alcalines qui rend les molécules instables mais bien le tampon diéthylamine lui-même. Les molécules du CMH de classe II I-E^k ont été utilisées comme témoins afin de s'assurer qu'elles étaient stables dans les mêmes conditions (puits 1 à 3).

Les résultats précédents (Figure 10) ont démontré l'instabilité des molécules du CMH de classe II I-E^P dans le tampon d'élution diéthylamine. Toutefois, nous avons également vérifié cette instabilité à partir de splénocytes de souris B6.ARK (I-E^k) et B10.P (I-E^P) afin de s'assurer que ce n'était pas un artefact de la lignée cellulaire CH27-E^P/EPM. Cette étape a été nécessaire afin de pouvoir éventuellement utiliser d'autres lignées cellulaires pour la purification et l'identification d'allopeptides naturels présentés par la molécule du CMH de classe II I-E^P. La Figure 11 montre que les molécules du CMH de classe II I-E^P provenant de splénocytes de souris sont également instables dans le tampon d'élution diéthylamine et ce, autant à pH 8,0 qu'à pH 10,5 (puits 8 et 10). De plus, les molécules du CMH de classe II I-E^P sont restées stables dans le tampon PBS pH 7,4 confirmant que l'instabilité des molécules I-E^P est due au tampon d'élution utilisé. Nous avons aussi chauffé à 100°C chacun des échantillons afin de s'assurer que nous étions bien en présence d'hétérodimères $\alpha\beta$ stables (puits 9, 11 et 14). Évidemment, suite au chauffage des molécules du CMH de classe II, ces dernières ne sont plus perceptibles par immunoempreinte de type « Western » lorsque l'anticorps 14.4.4s est utilisé (voir la Figure 8). Nous avons également utilisé les splénocytes provenant de souris B6.AKR (I-E^k) afin de pouvoir comparer la stabilité des molécules du CMH de classe II I-E^k en présence du même tampon d'élution. Bref, les résultats obtenus suite aux analyses de stabilité avec des splénocytes sont similaires à ceux obtenus avec des lignées cellulaires. Ainsi, l'instabilité des molécules du CMH de classe II I-E^P dans le tampon d'élution diéthylamine n'est donc pas causée par un artefact de la lignée cellulaire CH27-E^P/EPM, dont l'origine pourrait être associée au processus de transfection et de sélection des transfectants. Par exemple, la sélection de mutants déficients dans l'une

Figure 10 : **Instabilité des complexes du CMH de classe II I-E^P dans le tampon d'éluion diethylamine.** Les cellules CH27-E^P/EPM et CH27mHEL-Hb (2.0×10^9 cellules) ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 et des inhibiteurs de protéases. Les complexes I-E^k ont été adsorbés du lysat cellulaire provenant des cellules CH27-E^P/EPM par chromatographie d'affinité à l'aide d'une résine 17.3.3s-sépharose. Les lysats cellulaires contenant les molécules de classe II I-E^k ou I-E^P ont ensuite été immunoprécipités en utilisant une résine 14.4.4s-sépharose. Les complexes du CMH de classe II immunoprécipités ont été incubés 30 minutes à la température ambiante dans le tampon d'éluion 0,05 M diethylamine (pH 10,5 et pH 8,0) contenant les détergents MEGA-8, MEGA-9 et du NaCl ou dans un tampon PBS pH 7,4. Les complexes du CMH de classe II ont ensuite été analysés par immunoempreinte de type "Western" comme décrit précédemment.

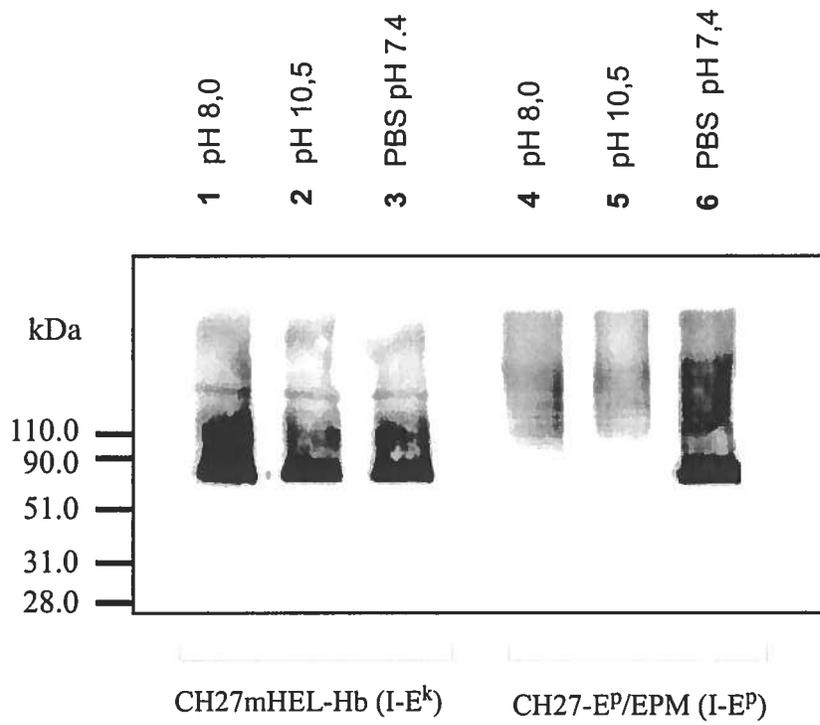
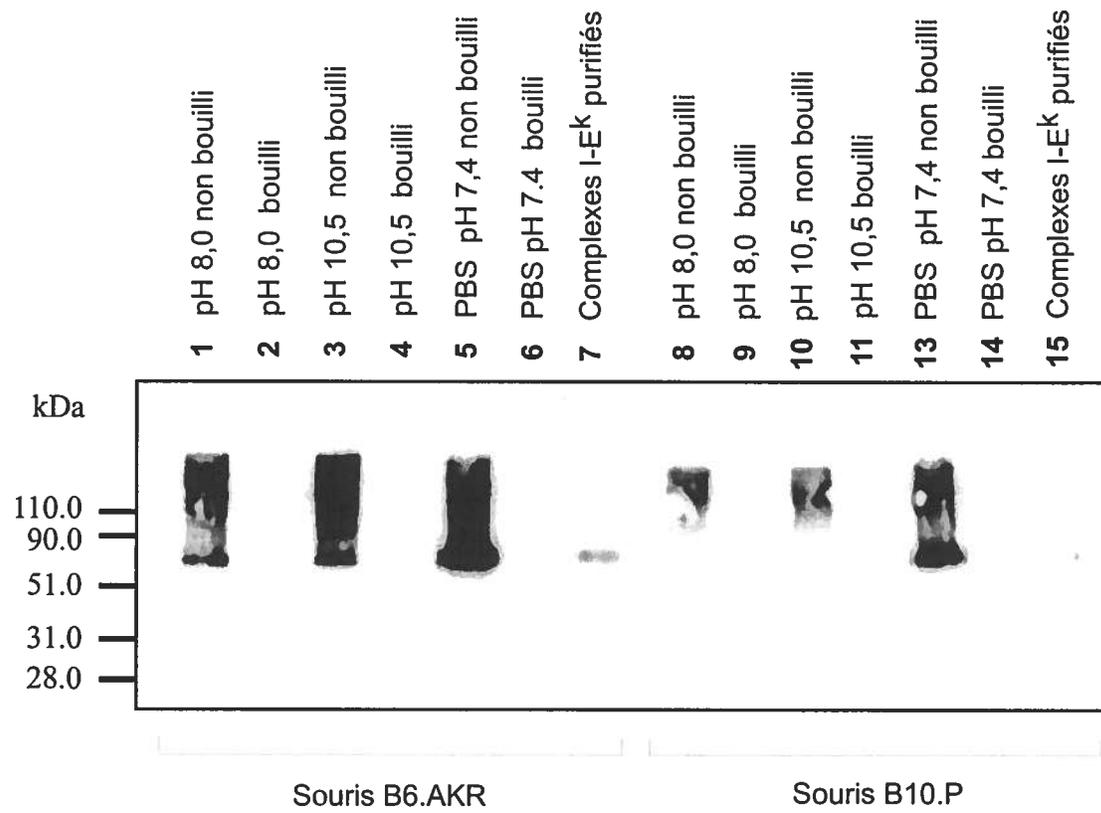


Figure 11 : **Instabilité des complexes du CMH de classe II I-E^p provenant de splénocytes de souris, dans le tampon d'élution diéthylamine.** Les splénocytes de souris B6.ARK et B10.P (3.0×10^7 cellules) ont été récupérés, lavés puis lysés dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 et des inhibiteurs de protéases. Le lysat cellulaire contenant les molécules de classe II I-E^k et I-E^p a ensuite été immunoprécipité en utilisant une résine 14.4.4s-sépharose. Les complexes du CMH de classe II immunoprécipités ont été incubés 30 minutes à la température ambiante dans le tampon d'élution 0,05 M diéthylamine (pH 10,5 ou pH 8,0) contenant les détergents MEGA-8, MEGA-9 et du NaCl ou dans un tampon PBS pH 7,4. Les complexes du CMH de classe II ont ensuite été analysés par immunoempreinte de type Western comme décrit précédemment.



des protéines importantes pour la biosynthèse des molécules du CMH de classe II (Ii, cathepsine, H-2M ect.) aurait pu provoquer l'instabilité des molécules I-E^P exprimées par la lignée CH27-E^P/EPM.

Puisque les molécules du CMH de classe II I-E^P sont instables dans le tampon d'élution diéthylamine, nous avons vérifié et comparé différents tampons d'élution (Figures 14 et 15). Les résultats présentés à la Figure 12 démontrent premièrement l'instabilité des molécules du CMH de classe II I-E^P dans certains tampons d'élution (0,1 M bicarbonate, 0,1 M borax et 0,1 M glycine) et ce tant à pH 10,5 qu'à pH 8,0, contrairement aux conditions utilisées pour la solubilisation (PBS pH 7,4). La Figure 13 montre néanmoins que les molécules du CMH de classe II I-E^P sont stables dans d'autres tampons d'élution testés. Les tampons 0,1 M phosphate et 0,1 M Tris à pH 10,5 et 0,1 M citrate-phosphate à pH 4,0 ont permis d'observer des molécules du CMH de classe II I-E^P stables suite à leur incubation dans ces tampons d'élution (puits 2, 4 et 6). De plus, les molécules du CMH de classe II I-E^P sont également stables dans les mêmes tampons à pH 8,0 (puits 3, 5 et 7). Ces trois tampons ont donc été sélectionnés pour l'élution de complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides stables suite à la séparation des molécules du CMH de classe II I-E^k par déplétion, à partir des cellules CH27-E^P/EPM.

4. OPTIMISATION DE LA MÉTHODE D'ÉLUTION DES COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II.

Suite à l'obtention de complexes du CMH de classe II I-E^P stables dans différents tampons d'élution, nous avons évalué l'efficacité d'élution des tampons Tris et phosphate à pH 10,5, en comparaison avec le tampon d'élution diéthylamine à pH 10,5. Cette étape d'optimisation a été nécessaire afin de s'assurer de pouvoir récupérer le maximum de molécules du CMH de classe II I-E^P stables. Pour ce faire, les cellules CH27mHEL-Hb ont été lysées et immunoprécipitées en utilisant une résine 14.4.4s-sépharose. Les complexes du CMH de classe II ont ensuite été incubés dans les différents tampons d'élution. Les échantillons ont été centrifugés légèrement afin de récupérer le surnageant contenant l'éluat. Le culot contenant la résine 14.4.4s-sépharose a également été récupéré

Figure 12 : **Instabilité des complexes du CMH de classe II I-E^p dans différents tampons d'éluion.** Les cellules CH27-E^p/EPM (2.0×10^9 cellules) ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 et des inhibiteurs de protéases. Les complexes I-E^k ont été adsorbés du lysat cellulaire provenant des cellules CH27-E^p/EPM par chromatographie d'affinité à l'aide d'une résine 17.3.3s-sépharose. Le lysat cellulaire contenant les molécules du CMH de classe II I-E^p a ensuite été immunoprécipité en utilisant une résine 14.4.4s-sépharose. Les complexes du CMH de classe II immunoprécipités ont été incubés 30 minutes à la température ambiante dans différents tampon d'éluion contenant tous les détergents MEGA-8, MEGA-9 et du NaCl ou dans un tampon PBS pH 7,4. Les complexes du CMH de classe II ont ensuite été analysés par immunoempreinte de type "Western" comme décrit précédemment

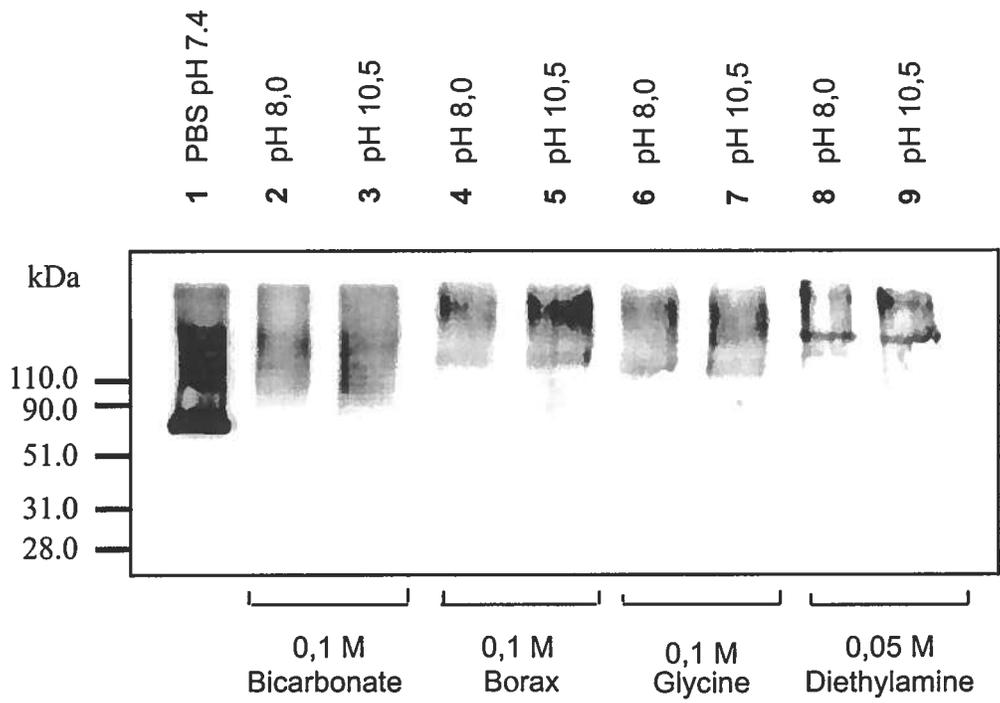


Figure 13 : Stabilité des complexes du CMH de classe II I-E^p dans différents tampons d'éluion. Les cellules CH27-E^p/EPM (2.0×10^9 cellules) ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 et des inhibiteurs de protéases. Les complexes I-E^k ont été adsorbés du lysat cellulaire provenant des cellules CH27-E^p/EPM par chromatographie d'affinité à l'aide d'une résine 17.3s-sépharose. Le lysat cellulaire contenant les molécules de classe II I-E^p a ensuite été immunoprécipité en utilisant une résine 14.4s-sépharose. Les complexes du CMH de classe II immunoprécipités ont été incubés 30 minutes à la température ambiante dans différents tampon d'éluion contenant tous les détergents MEGA-8, MEGA-9 et du NaCl ou dans un tampon PBS pH 7,4. Les complexes du CMH de classe II ont ensuite été analysés par immunoempreinte de type "Western" comme décrit précédemment.

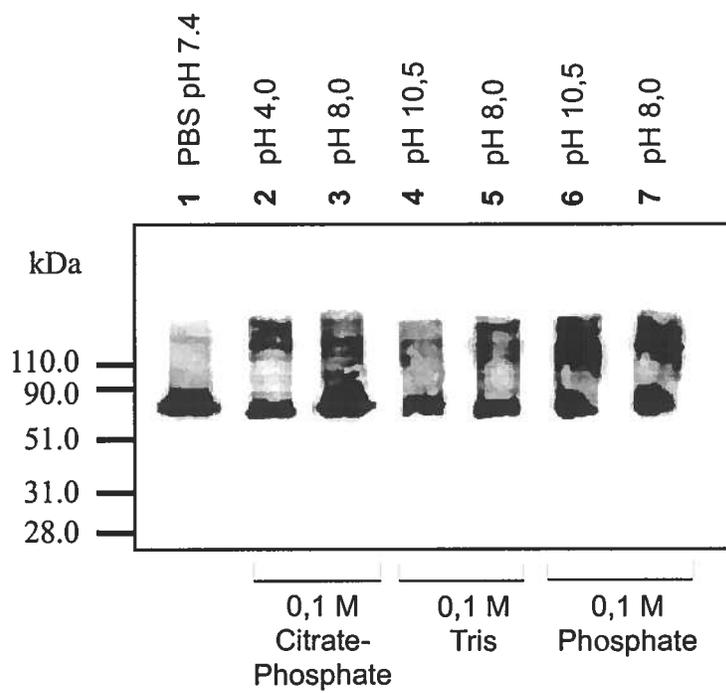
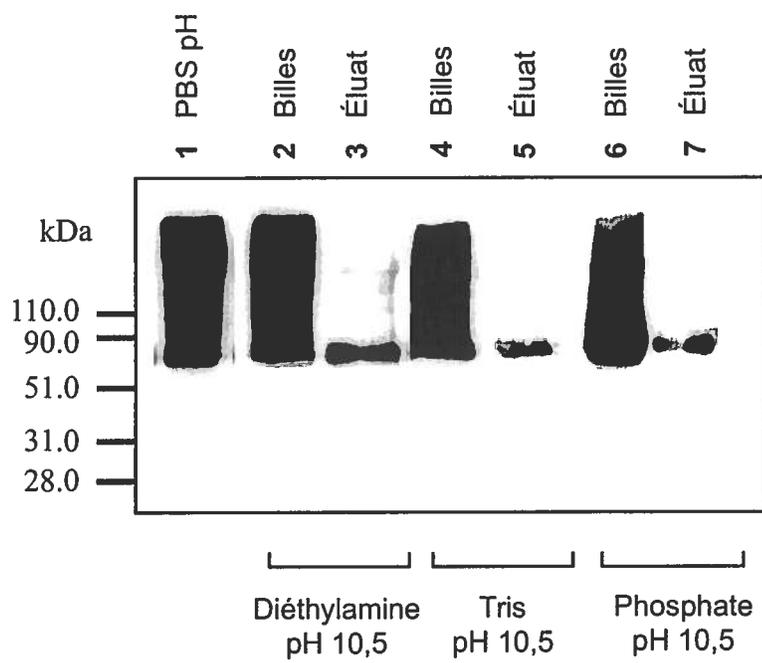


Figure 14 : Comparaison de l'élution des complexes du CMH de classe II I-E^k dans différents tampons. Les cellules CH27mHEL-Hb (2.0×10^8 cellules) ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 et des inhibiteurs de protéases. Le lysat cellulaire contenant les molécules de classe II I-E^k, a été immunoprécipité en utilisant une résine 14.4.4s-sépharose. Les complexes du CMH de classe II ont été incubés 30 minutes à la température ambiante dans différents tampons d'élution contenant tous les détergents MEGA-8, MEGA-9 et du NaCl ou dans un tampon PBS pH 7,4. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés légèrement afin de récupérer le surnageant contenant l'éluat. Le culot contenant la résine 14.4.4s-sépharose a été dilué avec 10 μ l de tampon PBS pH 7,4. Finalement, l'éluat et les billes de sépharose ont été dilués 1/2 dans le tampon d'échantillon et chargés en quantité équivalente sur un gel de polyacrylamide afin d'être analysés par immunoempreinte de type « Western » comme décrit précédemment.

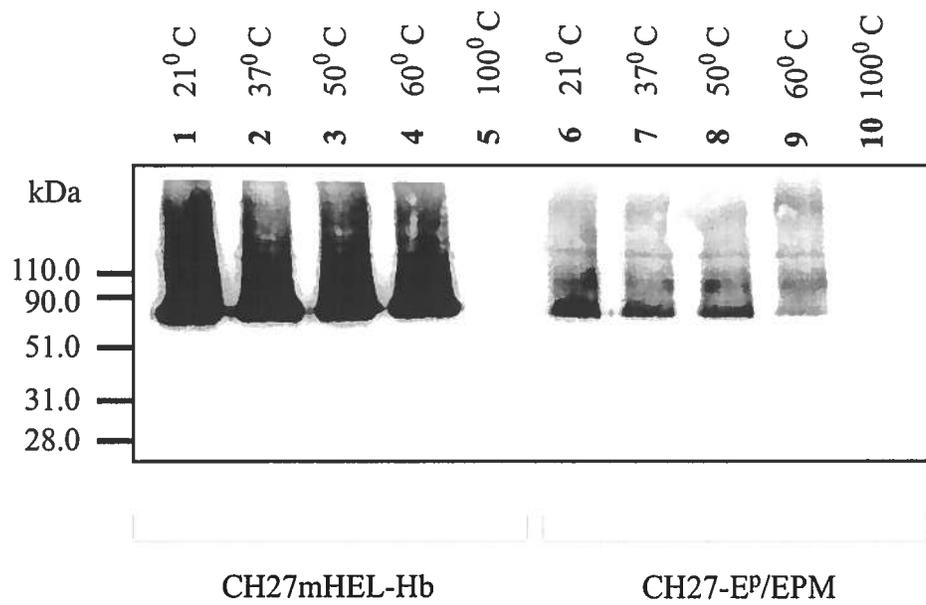


et dilué dans un tampon PBS pH 7,4. Finalement, l'éluat et les billes de sépharose ont été chargés en quantité équivalente sur un gel de polyacrylamide afin d'être analysés par immunoempreinte de type « Western ». La Figure 14 montre donc l'efficacité d'éluion des différents tampons d'éluion (puits 5 et 7) en comparaison avec le tampon d'éluion diéthylamine (puits 3). Puisqu'il ne semblait pas avoir de différence significative entre les tampons d'éluion utilisés, nous avons sélectionné le tampon d'éluion Tris pH 10,5 pour l'éluion des complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides stables. Il est à noter que la détection de complexes stables contenue sur la résine 14.4s-sépharoses après éluion (puits 2, 4 et 6) est principalement causée par l'incapacité de récupérer le volume mort, dû aux limites de la méthode.

5. CARACTÉRISATION DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II I-E^P STABLES.

Il a été rapporté dans la littérature que les complexes du CMH de classe II I-E^k peuvent être stables jusqu'à une température d'environ 60°C (Schafer *et al.*, 1998). Nous avons donc voulu, initialement, comparer la stabilité thermique des molécules du CMH de classe II I-E^P et I-E^k. L'étude a été effectuée conjointement avec des molécules du CMH de classe II I-E^k provenant des cellules CH27mHEL-Hb et des molécules du CMH de classe II I-E^P provenant des cellules CH27-E^P/EPM. Les molécules de classe II ont été incubées à différentes températures variant de la température de la pièce à 100°C. Les résultats de la Figure 15 confirme que les molécules de classe II I-E^k sont stables jusqu'à une température d'environ 60°C. Toutefois, lorsque ces dernières sont chauffées à 100°C, elles deviennent instables et donc indétectables en immunoempreinte de type « Western » en utilisant l'anticorps 14.4s. Pour leur part, les molécules du CMH de classe II I-E^P restent stables jusqu'à une température d'environ 50°C (puits 8). Ainsi, il est possible d'observer une légère perte de stabilité à partir de 37°C (puits 7). De plus, à 60°C (puits 9) les molécules I-E^P deviennent beaucoup moins stables. Finalement, comme les molécules de classe II I-E^k, les molécules I-E^P sont instables et donc indétectables en immunoempreinte de type « Western », lorsqu'elles sont chauffées à 100°C. Il a donc été observé, dans cette étude, que les molécules du CMH de classe II I-E^P semblent moins stables que les molécules de classe II I-E^k à des températures supérieures à 37°C.

Figure 15 : Comparaison de la stabilité thermique des complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^p. Les cellules CH27-E^p/EPM et CH27mHEL-Hb (2.0 x 10⁹ cellules) ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 et des inhibiteurs de protéases. Les complexes I-E^k ont été adsorbés du lysat cellulaire provenant des cellules CH27-E^p/EPM par chromatographie d'affinité à l'aide d'une résine 17.3.3s-sépharose. Les lysats cellulaires contenant les molécules de classe II I-E^k ou I-E^p ont d'abord été immunoprécipités en utilisant une résine 14.4.4s-sépharose. Les complexes du CMH de classe II immunoprécipités ont ensuite été incubés 30 minutes à différentes températures dans un tampon PBS pH 7,4. Les complexes du CMH de classe II ont finalement été analysés par immunoempreinte de type "Western" comme décrit précédemment. Toutefois, une quantité équivalente de complexes du CMH de classe II a été chargée dans chacun des puits du gel de polyacrylamide.



Nous avons également voulu comparer la quantité de molécules du CMH de classe II I-E^P et I-E^k présentes à la surface des cellules CH27-E^P/EPM. Cette expérience a été réalisée afin de déterminer si le maximum de molécules du CMH de classe II I-E^P ont pu être récupérées suite à leur solubilisation et à leur purification par chromatographie d'affinité, puisque nous voulions récupérer uniquement les molécules de classe II I-E^P. Nous avons donc exploité l'instabilité des molécules du CMH de classe II I-E^P dans le diéthylamine pour éliminer cette dernière des échantillons analysés par immunoempreinte de type « Western » (molécules I-E^k seules). Afin de comparer la quantité de molécules I-E^k et I-E^P, nous avons ensuite incubé l'autre moitié du lysat cellulaire dans un tampon PBS pH 7,4 récupérant ainsi les molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^P (molécules du CMH totales). La Figure 16 montre qu'il semble y avoir environ le double de molécules du CMH de classe II totales (PBS pH 7,4, dilution 1 :32) par rapport aux molécules du CMH de classe II I-E^k (diéthylamine pH 10,5, dilution 1 :32). La quantité de molécules du CMH de classe II I-E^P récupérées suite à la purification devrait donc être semblable à celles des molécules du CMH de classe II I-E^k à partir de la même quantité de cellules CH27-E^P/EPM.

6. PURIFICATION DE COMPLEXES I-E^P/EPM STABLES

Nous avons sélectionné l'approche par méthode indirecte pour la purification de complexes du CMH de classe II I-E^P stables. Dans cette approche, les complexes du CMH de classe II I-E^k provenant du lysat de cellules CH27-E^P/EPM ont d'abord été retirés par déplétion à l'aide d'une résine 17.3.3s-sépharose. Le filtrat, contenant les complexes du CMH de classe II I-E^P non purifiés, a ensuite été passé sur une résine 14.4.4s-sépharose afin de récupérer uniquement les complexes du CMH de classe II I-E^P purifiés. La Figure 17 montre un exemple de purification des complexes du CMH de classe II I-E^P et I-E^k à l'aide d'une résine 14.4.4s-sépharose. Les complexes CMH/peptides ont été élués dans le tampon 0,1 M Tris pH 10,5. Dans cette expérience, les fractions 4 à 10 ont été combinées et la quantité de protéine a été estimée à 1,8 mg/ml. Suite à la purification de complexes du CMH de classe II I-E^k/peptides et I-E^P/peptides, plusieurs analyses ont été effectuées afin de vérifier la stabilité des complexes I-E^P/peptides présents à la surface des cellules témoins CH27-E^P/EPM.

Figure 16 : Comparaison de la quantité de complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^p présents à la surface des cellules CH27-E^p/EPM. Les cellules CH27-E^p/EPM (2.0×10^9 cellules) ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 et des inhibiteurs de protéases. Les lysats cellulaires contenant les molécules de classe II I-E^k et I-E^p ont ensuite été immunoprécipités en utilisant une résine 14.4.4s-sépharose. Une dilution sérielle a été effectuée, juste avant d'incuber les complexes du CMH de classe II immunoprécipités 30 minutes à la température ambiante dans le tampon d'élution 0,05 M diéthylamine (pH 10,5) contenant les détergents MEGA-8, MEGA-9 et du NaCl ou dans un tampon PBS pH 7,4. Les complexes du CMH de classe II ont ensuite été analysés par immunoempreinte de type "Western" comme décrit précédemment. Une quantité équivalente de complexes du CMH de classe II a été chargée dans chacun des puits du gel de polyacrylamide.

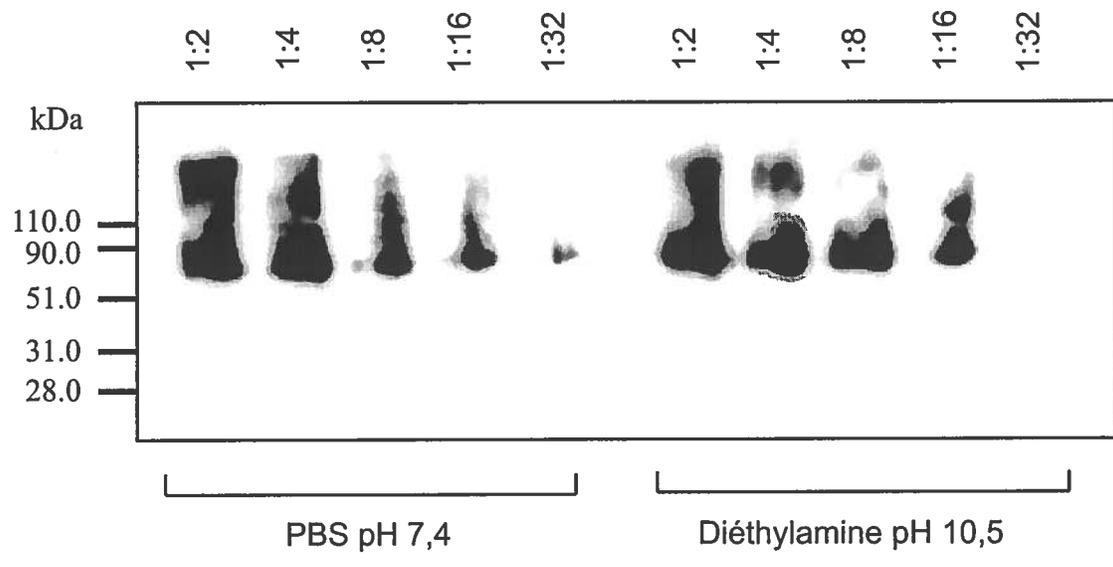
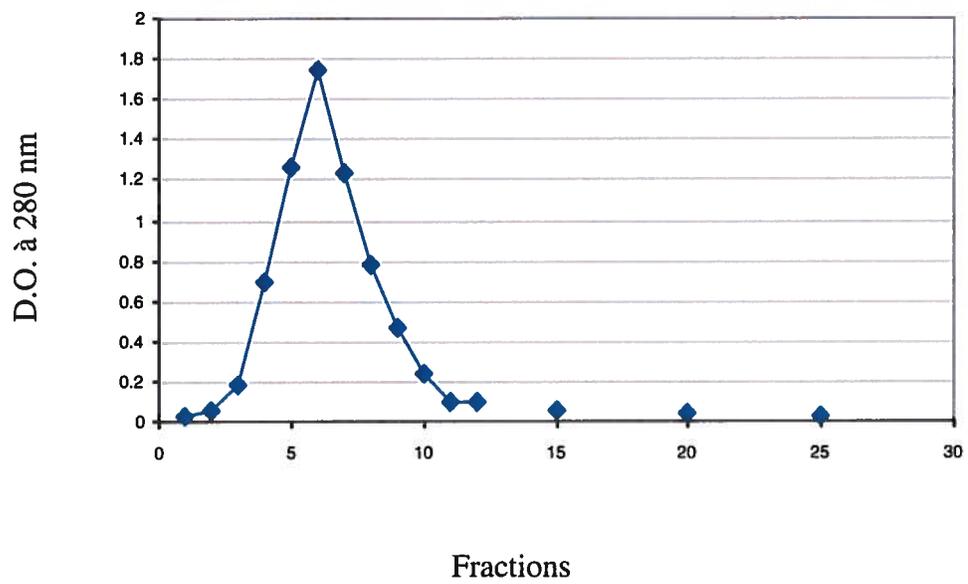
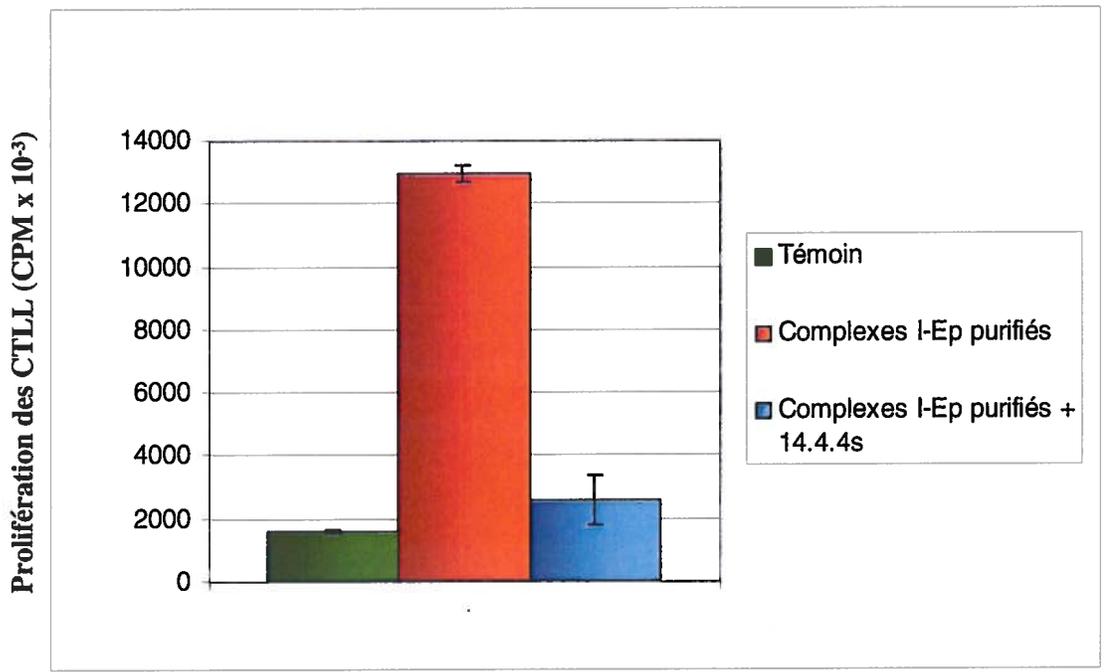


Figure 17 : Purification de complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^p par chromatographie d'affinité. Les cellules CH27-E^p/EPM ont été récupérées, lavées puis lysées dans un tampon de solubilisation contenant les détergents MEGA-8 et MEGA-9 ainsi que des inhibiteurs de protéases. Le lysat cellulaire a ensuite été centrifugé et adsorbé sur une résine 14.4.4s-sépharose. Les complexes I-E^p/peptides et I-E^k/peptides ont été élués dans un tampon 0,1 M Tris pH 10,5 contenant 0,15 M de NaCl et 20 mM de MEGA-8 et de MEGA-9. Des fractions de 1 ml ont été recueillies et la D.O. à 280 nm a été prise pour chacune de ces fractions. Les fractions ayant une densité optique supérieure à 0.2 à 280 nm ont été regroupées et conservées à 4°C. La concentration en protéine, en mg/ml, a été estimée selon le rapport de l'absorbance à 280nm divisée 1,5.



Les complexes purifiés I-E^P/peptide à partir des cellules CH27-E^P/EPM ont finalement été testés pour leur habilité à stimuler l'hybridome T 2.102. Pour ce faire, les complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides ont été purifiés dans les conditions optimales déjà établies. La stabilité des complexes a été vérifiée par immunoempreinte de type « Western ». Ces complexes purifiés ont ensuite été distribués dans un plateau 96 puits à différentes dilutions et adsorbés aux puits, tel que décrit à la section 7 de l'approche expérimentale, puis les hybridomes T 2.102 ont été ajoutés. La production d'IL-2 par l'activation d'hybridome T 2.102 a été vérifiée en utilisant la lignée cellulaire dépendante pour l'IL-2, CTLL-2. La Figure 18 montre l'activation de l'hybridome par les complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides purifiés à la dilution 1/16 qui est optimale pour cet essai. Cette activation est due à la reconnaissance d'une densité élevée de complexes EPM/I-E^P telle qu'exprimée pour les cellules CH27-E^P/EPM. Il est à noter qu'il n'y a pas de cellule présentatrice d'antigène en présence des complexes purifiés, ce qui indique que l'activation des hybridomes T 2.102 provient uniquement de la reconnaissance du peptide présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P purifiée. De plus, afin de s'assurer de la spécificité de la réaction, l'anticorps 14.4.4s (anti-chaîne α de I-E) a été ajouté à certains puits, bloquant ainsi la reconnaissance du complexe CMH/peptide par l'hybridome T 2.102. Les résultats montrent que l'ajout de cet anticorps inhibe la réactivité, démontrant donc que la réaction est réellement due à la présentation des peptides EPM par les molécules du CMH de classe II I-E^P. Toutefois, les résultats obtenus avec d'autres dilutions sont difficilement interprétables, entre autres parce que cet essai n'était pas alors optimisé. Les résultats obtenus après optimisation sont montrés en annexe (annexe 2). Finalement, il est donc possible de stimuler les hybridomes T 2.102 à partir de complexes du CMH de classe II I-E^P/EPM purifiés provenant de cellules CH27-E^P/EPM. Les cellules CH27-E^P/EPM ont été utilisées comme témoin positif afin de s'assurer de l'efficacité des hybridome T 2.102 et des cellules CTLL. En conclusion, ces résultats démontrent clairement que nous avons purifié des molécules du CMH de classe II I-E^P stables qui en plus, présentent le peptide EPM puisque les hybridomes T 2.102 ont été fortement stimulés.

Figure 18: **Test d'activation d'hybridomes à partir de complexes du CMH de classe II I-E^P purifiés.** Les complexes purifiés I-E^P/peptide à partir des cellules CH27-E^P/EPM ont été testés pour leur habilité à stimuler l'hybridome T 2.102. Les complexes du CMH de classe II ont été élués dans le tampon Tris pH 10.5 contenant les détergents MEGA-8, MEGA-9 et du NaCl. Les complexes purifiés du CMH de classe II ont ensuite été distribués dans les puits d'un plateau 96 puits à différentes dilutions et en triplicata, et incubés pendant 16 h à la température de la pièce. Les plateaux ont ensuite été lavés avec du RPMI, les cellules T 2.102 ont été ajoutées (5×10^4 cellules /puits) et la culture cellulaire a été incubée pendant 18-24 h à 37°C dans une atmosphère 5 % CO₂. L'anticorps 14.4.4s (1 µg/ml) a été ajouté dans certains puits. La production d'IL-2 par l'activation de hybridome T 2.102 a été vérifiée en utilisant la lignée cellulaire dépendante pour l'IL-2, CTLL-2.



DISCUSSION

1. PURIFICATION DES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II STABLES.

Cette étude nous a permis, dans un premier temps d'établir des conditions optimales de purification de molécules du CMH de classe II dans lesquelles les complexes I-E^P/allopeptides sont stables. Cette étape d'optimisation a été essentielle puisque les complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides sont instables dans des conditions standard de purification des molécules du CMH de classe II comme I-E et I-A (Carrasco-Marin *et al.*, 1996; Luescher et Unanue, 1990b; Nelson *et al.*, 1996; Schafer *et al.*, 1998). Dans un deuxième temps, nous avons également démontré que les complexes du CMH de classe II I-E^P/EPM stables obtenus pouvaient stimuler fortement l'hybridome T 2.102.

L'alloréactivité des cellules T 2.102 a été reconstituée suite à une transfection des cellules CH27 (H-2^k), un lymphome de cellules B, avec la chaîne β de I-E^P. Les complexes du CMH de classe II I-E^P/allopeptides présents à la surface des cellules CH27-E^P stimulent donc la cellule T 2.102 (Daniel *et al.*, 1998b). Afin de déterminer que la stimulation de la cellule T 2.102 était réellement causée par la présentation d'un allopeptide par la molécule du CMH de classe II I-E^P, et non par une plus forte reconnaissance du CMH par l'hybridome T, une étude avait déjà été réalisée par l'équipe du Dr. Allen en 1998 (Daniel *et al.*, 1998b). Dans cette étude, des cellules CHO ont tout d'abord été transfectées avec les chaînes I-E α et I-E^P β afin d'exprimer à la surface cellulaire des molécules du CMH de classe II I-E^P. Ensuite, ces lignées cellulaires ont été testées pour leur habilité à stimuler l'hybridome T 2.102. Toutefois, les hybridomes T 2.102 n'ont pas été activés même si les molécules I-E^P étaient exprimées à la surface cellulaire. La reconstitution de l'alloréactivité avec EPM est la preuve directe qu'elle est peptide dépendante. Ces résultats ont démontré que l'alloréactivité de la cellule T 2.102 est principalement dépendante de la reconnaissance d'un allopeptide présenté par les molécules du CMH de classe II I-E^P et que les cellules CHO-E^P ne pouvaient procurer cet allopeptide (Daniel *et al.*, 1998b).

L'identification et la caractérisation de la forme naturelle du peptide Hb(64-76) présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^k et reconnu par la cellule T 2.102 (Vidal *et al.*, 2000) a mené à la première tentative d'identifier l'allopeptide naturel reconnu par la cellule T 2.102 et présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P. La méthode utilisée pour tenter d'identifier cet allopeptide naturel est basée sur une approche

biochimique de purification de peptides (Nelson *et al.*, 1996; Rudenski, 1991) dans laquelle les molécules I-E des cellules CH27-E^P ont été purifiées par chromatographie d'affinités et les peptides associés ont été libérés par traitements acides et séparés par HPLC. Toutefois, aucune fraction obtenue de la séparation par HPLC n'a permis la stimulation de la cellule T 2.102 (Daniel *et al.*, données non publiées). Plusieurs hypothèses ont donc été émises afin d'expliquer pourquoi aucune fraction capable de stimuler l'hybridome 2.102 n'avait été identifiée. Tout d'abord, il est possible que les complexes I-E^P/allopeptides soient instables suite aux diverses étapes de purification dû soit à une faible liaison entre les chaînes α et β ou soit à la dissociation du peptide de l'hétérodimère $\alpha\beta$, provoquant ainsi l'instabilité de la molécule du CMH de classe II. De plus, il n'y avait aucun témoin disponible permettant d'évaluer la stabilité des molécules du CMH de classe II I-E^P. La cause potentielle pouvant expliquer ces hypothèses repose sur la différence entre les molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^P.

1.1. Nécessité d'une lignée cellulaire témoin.

La construction d'un ligand peptidique (EPM) présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P et reconnu par la cellule T 2.102 a donc été essentielle pour l'obtention d'un témoin efficace pour la purification de molécules du CMH de classe II I-E^P stables (Daniel *et al.*, 1998b). L'identification d'un peptide témoin a également été nécessaire pour la comparaison de la stabilité des molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^P et la validation de la méthode de purification. L'allopeptide EPM a été identifié par criblage d'une banque peptidique combinatoire dont les sites d'encrages à la molécule I-E^P ont été sélectionnés selon un motif préalablement identifié. De plus, un peptide restreint à I-E^P a été initialement identifié en utilisant la β -galactosidase comme modèle d'antigène (Daniel *et al.*, 1998b).

Suite à la construction de l'allomimotope EPM, une lignée cellulaire exprimant de façon constitutive des complexes du CMH de classe II I-E^P/EPM a été générée. La lignée cellulaire CH27-E^P/EPM possède donc la particularité d'exprimer une forte densité de complexes du CMH de classe II I-E^P/EPM, permettant ainsi de stimuler efficacement la cellule T 2.102 (données non publiées) (Annexe 1). La purification de molécules du CMH de classe II I-E^P pour ce projet a donc été facilitée par l'utilisation de cette lignée cellulaire témoin.

2. CARACTÉRISATION DES ANTICORPS 14.4.4S, 17.3.3S ET 2B6.B8.

La purification des molécules du CMH de classe II I-E^P et I-E^k a nécessité l'utilisation d'anticorps spécifiques contre les différentes chaînes des molécules du CMH de classe II. L'anticorps 14.4.4s, un anti-chaîne α de I-E, a été abondamment utilisé puisqu'il était spécifique aux deux molécules du CMH de classe II. Deux méthodes avaient été mises de l'avant pour la purification de molécules du CMH de classe II I-E^P. Dans la méthode directe, l'anticorps 2B6.B8, un anti-chaîne β de I-E^P, était couplé à une résine de sépharose 4B activée au CNBr (2B6.B8-sépharose), permettant ainsi d'éluer directement des molécules du CMH de classe II I-E^P. Toutefois, puisque cet anticorps a une réactivité croisée avec la molécule du CMH de classe II I-E^k il n'a pas pu être utilisé puisqu'il devenait impossible de s'assurer qu'il n'y avait pas contamination avec la molécule I-E^k également exprimée à la surface des cellules CH27-E^P/EPM. La méthode indirecte c'est à dire par déplétion, a donc été sélectionnée afin de pouvoir séparer les molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^P provenant des cellules témoins CH27-E^P/EPM. La mise au point des différentes étapes de purification a été primordiale pour la continuité du projet, c'est-à-dire pour la purification de complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides stables.

3. DÉTERMINATION D'UNE MÉTHODE DE DÉTECTION DES COMPLEXES DU CMH DE CLASSE II STABLES.

Plusieurs techniques sont utilisées pour la détection de molécules du CMH de classe I et II. Toutefois, la plus utilisée nécessitent le marquage radioactif des cellules exprimant les molécules du CMH (Luescher et Unanue, 1990b; Schafer *et al.*, 1998). Nous avons donc sélectionné trois méthodes simples de détection d'hétérodimères $\alpha\beta$ qui allaient nous permettre de déterminer les conditions optimales de purification des molécules du CMH de classe II I-E^P en comparant avec les molécules du CMH de classe II I-E^k. La première méthode par immunoempreinte ponctuelle s'est par contre avérée inefficace. Cette technique permet de quantifier les chaînes α et β individuelles mais ne permet pas de détecter des hétérodimères $\alpha\beta$ et ce, même avec les molécules du CMH de classe II I-E^k qui sont normalement stables. De plus, puisque l'anticorps 2B6.B8 possède une réactivité croisée avec la chaîne β de I-E^k, il nous aurait été impossible de s'assurer qu'il n'y avait pas contamination du filtrat, contenant les molécules du CMH de classe II I-E^P,

avec les molécules I-E^k. La deuxième technique choisie était le test ELISA. Cette technique a été efficace puisque des hétérodimères $\alpha\beta$ pouvaient être détectés par capture d'antigènes. Néanmoins, même si des hétérodimères $\alpha\beta$ stables provenant de cellules CH27mHEL-Hb ont été détectés, le même problème survenait pour la détection d'hétérodimères $\alpha\beta$ provenant des cellules témoins CH27-E^P/EPM puisque l'anticorps 2B6.B8 ne pouvait être utilisé.

Nous avons donc adopté la méthode par immunoempreinte de type « Western ». Cette nouvelle technique a déjà été utilisée par l'équipe de Pierce (Schafer *et al.*, 1998) en utilisant les anticorps 17.3.3s et Y-17 pour la détection de complexes du CMH de classe II I-E^k. Les résultats ont démontré que l'anticorps 17.3.3s pouvait non seulement détecter des hétérodimères $\alpha\beta$ stables, mais également des chaînes β dissociées ainsi que des superdimères $(\alpha\beta)_2$ à 120 kDa. La spécificité exacte de cet anticorps n'est pas encore connue. Il a par contre été suggéré que l'anticorps 17.3.3s réagirait contre un épitope présent dans le domaine $\beta 1$ (Lombardi *et al.*, 1991; Schafer *et al.*, 1998). Nous avons ainsi utilisé une technique semblable dans laquelle l'anticorps 14.4.4s a également été testé. La Figure 8 démontre bien la présence d'hétérodimères $\alpha\beta$ stables en présence des deux anticorps utilisés. Par contre, seul l'anticorps 17.3.3s permet la détection de chaînes dissociées. Cette technique toute simple a donc été privilégiée puisqu'elle permettait également de réaliser des expériences par immunoprécipitation, et ainsi, de travailler directement avec l'antigène solubilisé. Toutefois, une méthode de séparation des molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^P, exprimées à la surface des cellules témoins CH27-E^P/EPM, a dû être mise au point afin d'utiliser cette technique.

Les résultats obtenus ont permis de confirmer que les molécules du CMH de classe II I-E^P n'étaient pas stables dans le tampon d'élution 0,05 M diéthylamine pH 10,5 contrairement à la majorité des molécules du CMH de classe II (Luescher et Unanue, 1990b). De plus, afin de s'assurer que l'instabilité des molécules du CMH de classe II I-E^P n'était pas due à un artéfact de la lignée cellulaire témoin, nous avons repris l'expérience avec des molécules du CMH de classe II provenant de splénocytes de souris B10.P et B6.AKR. La Figure 11 démontre donc clairement que les molécules du CMH de classe II I-E^P restent instables dans les conditions d'élution standard. Par la suite, nous avons vérifié différents tampons d'élution comme le borax, la glycine ou le bicarbonate, dans lesquels les molécules du CMH de classe II I-E^P n'étaient pas stables. Heureusement, nous avons obtenu des molécules du CMH de classe II I-E^P stables dans

des tampons d'éluion comme le Tris ou le phosphate. Les résultats démontrent également que l'instabilité des molécules du CMH de classe II I-E^P provient assurément de l'éluion puisque ces dernières sont stables dans un tampon PBS pH 7,4 juste avant l'éluion.

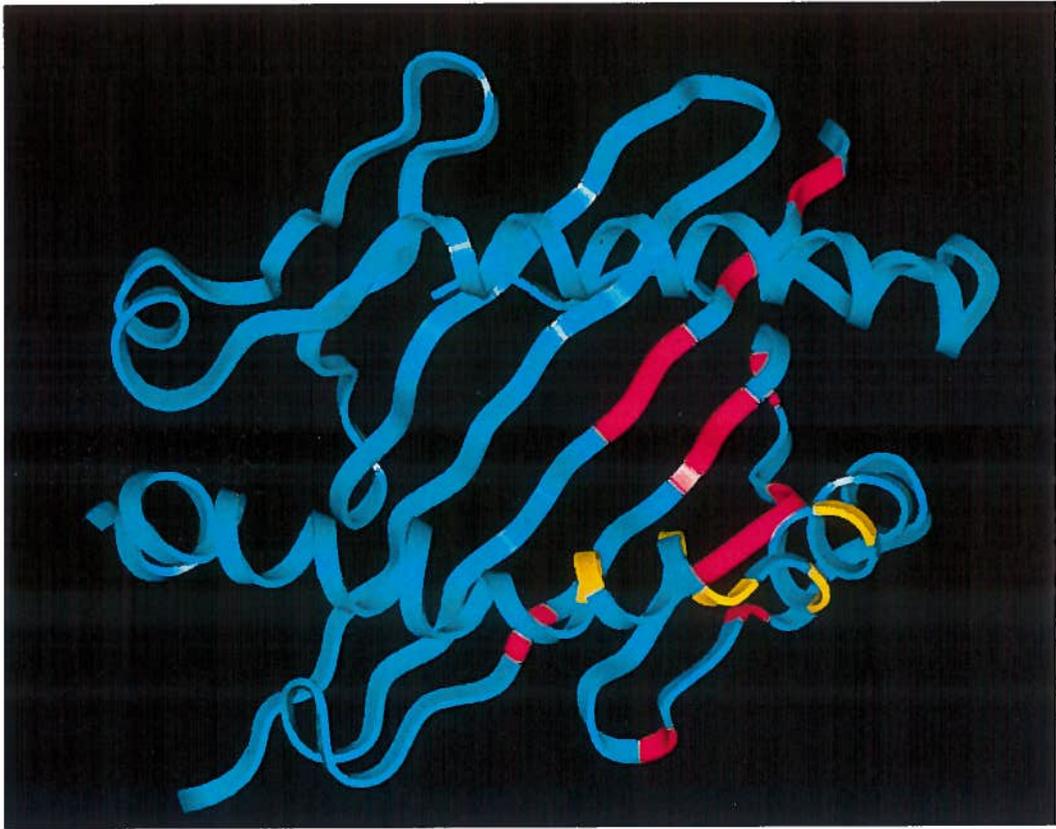
3.1. Causes potentielles de l'instabilité des molécules I-E^P

Les molécules du CMH de classe II I-E^P ont une chaîne α identique à celle des molécules du CMH de classe II I-E^k. Cependant, la chaîne β des deux molécules diffèrent à 20 positions (Daniel *et al.*, 1998b; Wei *et al.*, 1996). Parmi les 20 différences, six sont localisées sur l'hélice α de la niche peptidique de la chaîne β alors que les 14 autres différences sont localisées sur le feuillet β de la niche peptidique (Figure 21) (Daniel *et al.*, 1998b). Ces différences au niveau de la chaîne β pourraient donc provoquer l'instabilité de la molécule du CMH de classe II I-E^P. En effet, des changements au niveau de la chaîne β de la molécule du CMH de classe II I-E^P peuvent engendrer des différences de liaisons entre les chaînes α et β . Il est également possible que ce soit une liaison faible entre le peptide et l'hétérodimère $\alpha\beta$ qui empêche la stabilité de la molécule.

De plus, le peptide β -gal(450-462), restreint à la molécule du CMH de classe II I-E^P, possède une isoleucine en position d'ancrage P1 comme la majorité des autres peptides se liant aux molécules du CMH de classe II I-E, qui nécessite un résidu aliphatique (isoleucine, leucine ou valine) à cette position (Fremont *et al.*, 1996; Rammensee *et al.*, 1995). Néanmoins, ce peptide détient une sérine en position d'encrage P9, contrairement à la majorité des peptides présentés par les molécules de classe II I-E qui ont généralement une lysine ou une arginine à cette position (Figure 22). Il est donc possible que ce résidu ne fasse pas le pont salin avec la région E β 9 conservée sur toutes les chaînes I-E β (Daniel *et al.*, 1998b; Fremont *et al.*, 1996). De plus, la substitution de la sérine en position P9 avec une lysine abolit complètement la présentation du peptide (Daniel *et al.*, 1998b).

Puisque l'instabilité de la molécule de classe II peut être provoquée soit par une liaison fragile des chaînes α et β ou par une faible liaison du peptide, deux hypothèses ont été émises suite à l'obtention de molécules du CMH de classe II I-E^P instables dans des conditions standard de purification. Premièrement, il est probable que les tampons

Figure 19: Localisation des résidus polymorphiques entre les molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^p. Les molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^p ont une chaîne α identique. Cependant, leurs chaînes β diffèrent à 20 positions. Parmi les 20 différences, six sont localisées sur l'hélice α de la niche peptidique de la chaîne β (jaune) alors que les



$\alpha 1$

$\beta 1$

Figure 20: Construction d'un allomimotope (EPM) présenté par la molécule du CMH de classe II I-E^P et reconnu par la cellule T 2.102. L'allomimotope EPM a été identifié par criblage d'une banque peptidique combinatoire dont les sites d'encrages (P1 et P9) à la molécule I-E^P ont été sélectionnés selon un motif préalablement identifié. Un peptide restreint à I-E^P a été initialement identifié en utilisant la β -galactosidase comme modèle d'antigène (β -gal(450-462)). Tiré de Daniel *et al*, 1998b.

	P1	P9
Hb (64-76)	G K K V I T A F N E G L K	
β -gal (450-462)	H P S V I I W S L G N E S	
EPM	G K K V I T F S W G S L S	

d'élution diéthylamine, borax, glycine et bicarbonate interfèrent avec les liens contribuant à la stabilité des chaînes α et β . Ce n'est, par contre, pas le pH alcalin qui déstabilise ces liens puisque les molécules du CMH de classe II I-E^P restent stables dans le tampon Tris ou le tampon phosphate qui sont également à pH 10,5. De plus, il est à noter que les molécules du CMH de classe II I-E^P sont moins stables que les molécules I-E^k suite à un chauffage de plus de 37°C, ce qui supporte également l'hypothèse d'une liaison faible entre les chaînes ou le peptide. Il est par contre malheureusement impossible pour l'instant de déterminer la raison qui causerait l'instabilité entre les chaînes α et β due au tampon diéthylamine. Deuxièmement, puisque le diéthylamine est formé de 2 chaînes aliphatiques, il est possible que ces chaînes compétitionnent avec le résidu en position d'ancrage P9 du peptide qui est une sérine. En effet, la sérine est formée également d'une chaîne aliphatique. Dans ce cas, le peptide se serait donc détaché, ce qui causerait ensuite la déstabilisation de l'hétérodimère $\alpha\beta$ I-E^P. Il est à noter que les tampons Tris et phosphate ne sont pas formés de chaînes aliphatiques, ce qui ne provoquerait pas de compétition pour le peptide. La molécule du CMH de classe II resterait donc stable suite à l'incubation dans ces tampons. Cette hypothèse reste à être confirmée dans des travaux futurs.

3.2. Caractérisation des complexes I-E^P/EPM stables

Suite à la purification d'hétérodimères $\alpha\beta$ stables à partir de cellules CH27-E^P/EPM, nous avons effectué un test d'activation d'hybridomes afin de s'assurer que les peptides EPM étaient toujours associés aux molécules du CMH de classe II I-E^P. En effet, dans cet essai, seules les molécules du CMH de classe II purifiées ont été ajoutées conjointement aux cellules T 2.102, sans aucune cellule présentatrice d'antigènes. Les résultats obtenus démontrent clairement une forte stimulation de la cellule T 2.102. Ces résultats étaient attendus puisque les cellules témoins CH27-E^P/EPM expriment une forte densité de complexes du CMH de classe II I-E^P/EPM, ce qui permet également de stimuler grandement la cellule T 2.102 (Annexe I). De plus, puisque nos résultats suggèrent une quantité équivalente de complexes du CMH de classe II I-E^k et I-E^P récupérés à partir des cellules CH27-E^P/EPM, la présentation d'au moins la moitié des complexes CMH/peptides présent à la surface d'environ 5×10^6 cellules serait optimale pour permettre la stimulation des hybridomes T 2.102. Afin de s'assurer que la stimulation de la cellule T 2.102 provenait directement de la présentation du peptide EPM, nous avons ajouté l'anticorps 14.4.4s (anti-chaîne α de I-E) bloquant ainsi la reconnaissance du

complexe CMH/peptide par l'hybridome T 2.102. Les résultats obtenus montrent que l'ajout de cet anticorps inhibe la réactivité et donc que la réaction est réellement due à la présentation des peptides EPM par les molécules du CMH de classe II I-E^P. Nos résultats démontrent donc clairement que nous avons purifié des molécules du CMH de classe II I-E^P stables qui en plus, présentent le peptide EPM puisque les hybridomes T 2.102 ont été fortement stimulés.

Afin de déterminer les bases moléculaires de l'instabilité de la molécule du CMH de classe II I-E^P dans le tampon d'élution diéthylamine, il serait possible de muter la chaîne β de la molécule du CMH de classe II I-E^P par des résidus de la molécule du CMH de classe II I-E^k, à trois endroits importants pour la liaison des chaînes α et β , soit les positions 8, 10 et 11. Si la molécule du CMH de classe II I-E^P mutée est stable dans le tampon diéthylamine, nous pourrions conclure que la présence d'une faible liaison entre les chaînes α et β causerait l'instabilité des molécules du CMH de classe II I-E^P dans le tampon d'élution diéthylamine. Toutefois, il serait également possible qu'il y ait eu modification du répertoire peptidique suite aux différentes mutations. La présentation de peptides restreints à I-E^P (β -gal (450-462) ou EPM) présentés par la molécule I-E^P mutée et sauvage devra donc être comparée.

Dans cette étude, nous avons établi des conditions optimales de purification de complexes du CMH de classe II I-E^P/EPM stables. Toutefois, plusieurs étapes restent à être effectuées avant de pouvoir purifier les complexes du CMH de classe II I-E^P/allopeptides naturels présents sur les cellules CH27-E^P, qui permettent également la stimulation de la cellule T 2.102. L'identification des l'allopeptides naturels présentés par les molécules du CMH de classe II I-E^P et reconnu par la cellule T 2.102 sera donc effectuée en reprenant l'expérience dans les conditions optimales obtenues dans cette étude. Brièvement, les complexes du CMH de classe II I-E^P et I-E^k présents à la surface des cellules témoins seront séparés par une méthode indirecte de purification par chromatographie d'affinités. Ensuite, les complexes I-E^P/allopeptides seront élués dans le tampon Tris pH 10,5 et testés pour leur habilité à stimuler la cellule T 2.102. Toutefois, une lignée de cellules présentatrices d'antigènes, exprimant des complexes du CMH de classe II I-E^P/allopeptides (CH27-E^P), sera utilisée. Les peptides associés seront ensuite libérés par traitements acides et fractionnés par HPLC sur une colonne à phase renversée. Les différentes fractions seront testées afin de vérifier leur habileté à stimuler la cellule T 2.102 et les fractions d'HPLC ayant une activité stimulatrice seront analysées en

spectrométrie de masse afin de déterminer la séquence en acides aminé des allopeptides recherchés.

D'autres stratégies peuvent également être utilisées afin d'identifier des allopeptides naturels présentés par des molécules du CMH de classe II et reconnus par une cellule T. En effet, il est possible d'identifier différents épitopes par une approche basée sur l'expression d'une banque d'ADNc ciblée vers les compartiments cellulaires nécessaires au chargement des peptides sur les molécules du CMH de classe II. Cette technologie permet donc par criblage fonctionnel de banques d'ADNc, d'identifier des épitopes T naturels (Malarkannan *et al.*, 1995; Malarkannan *et al.*, 1996; Mendoza *et al.*, 1997; Sanderson *et al.*, 1995). Cependant, même si un ou des allopeptides étaient identifiés par cette approche, il serait toujours nécessaire de confirmer que ces allopeptides naturels sont présentés à la surface des splénocytes de souris exprimant des molécules du CMH de classe II I-E^P et qu'ils stimulent l'alloréactivité de la cellule T 2.102. Toutefois, les peptides doivent être purifiés par une approche biochimique, d'où l'importance de ce projet ayant pour but de purifier des complexes du CMH de classe II I-E^P/peptides stables par une approche biochimique.

CONCLUSION

Le but de cette étude était de purifier des complexes du CMH de classe II I-E^P/allopeptides stables. Toutefois, nous avons démontré que les molécules du CMH de classe II I-E^P n'étaient pas stables dans des conditions standard de purification de molécule du CMH de classe II et ce dû, soit à une faible liaison entre les chaînes α et β de l'hétérodimère ou soit par une force de liaison fragile entre le peptide et la molécule du CMH de classe II. Nous avons donc élaboré un protocole qui permet la purification optimale de molécules du CMH de classe II I-E^P en utilisant une lignée cellulaire témoin nommée CH27-E^P/EPM. Avec ce témoin, nous avons donc réussi à purifier des complexes du CMH de classe II I-E^P/EPM stables qui stimulent fortement la cellule T 2.102. Ces conditions optimales de purification de molécules du CMH de classe II serviront ensuite pour l'identification des l'allopeptides naturels présentés par les molécules du CMH de classe II I-E^P et reconnus par la cellule T 2.102. L'identification d'un tel peptide permettrait d'obtenir plus d'informations sur les interactions moléculaires dans l'alloréactivité directe ainsi que de permettre une meilleure caractérisation du modèle de cellule T 2.102 utilisé dans l'étude des rejets d'allogreffes. De plus, l'identification d'un ou de plusieurs allopeptides permettrait également de vérifier comment il(s) pourrait(ent) influencer l'alloréponse *in vivo*.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Allen, P. M., Gutmann, D. H., Sher, M. R., and Niederhuber, J. E. 1984. Characterization of three new intra-I region recombinant mouse strains, B10.ASR7 (H-2as3), B10.BAR4 (H-2h6), and B10.BASR1 (H-2as4). *Immunogenetics* 19: 175-178.
- Babbitt, B. P., Allen, P. M., Matsueda, G., Haber, E., and Unanue, E. R. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317: 359-361.
- Babbitt, B. P., Matsueda, G., Haber, E., Unanue, E. R., and Allen, P. M. 1986. Antigenic competition at the level of peptide-Ia binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4509-4513.
- Begovich, A. B. and Erlich, H. A. 1995. HLA typing for bone marrow transplantation. New polymerase chain reaction-based methods. *JAMA* 273: 586-591.
- Benichou, G. 1999. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci* 4: D476-480.
- Bevan, M. J. 1984. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol Today* 5: 128-130.
- Bevan M.J. 1977 Cytotoxic t-cell response to histocompatibility antigens: the role of H-2. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*41 : 2:519-27.
- Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512.
- Bodmer, J. G., Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Charron, D., Dupont, B., Erlich, H. A., Mach, B., Mayr, W. R., and et, a. l. 95. Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Vox Sang* 69: 359-372.
- Bover, K.H. 1927. Homoisotransplantation van Epidermis bei eineigen Zwillingen. *Beitr. Klin. Chir.* 141: 442-447.
- Bradley, J. A. 1996. Indirect T cell recognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol* 13: 245-255.
- Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33-39.
- Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., and Grey, H. M. 1988. Autologous peptides constitutively occupy the antigen binding site on Ia. *Science* 242: 1045-1047.
- Buus, S., Sette, A., Colon, S. M., Jenis, D. M., and Grey, H. M. 1986. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 47: 1071-1077.

- Carrasco-Marin, E., Shimizu, J., Kanagawa, O., and Unanue, E. R. 1996. The class II MHC I-Ag7 molecules from non-obese diabetic mice are poor peptide binders. *J Immunol* 156: 450-458.
- Chicz, R. M., Urban, R. G., Lane, W. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Vignali, D. A., and Strominger, J. L. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 358: 764-768.
- Colombani. 1993.
- Cook, J. L., Hibbs, J. B. Jr, and Lewis, A. M. Jr. 1981. A relationship between SV40-transformed cell susceptibility to macrophage killing and tumor induction in rodents. *Adv Exp Med Biol* 134: 177-187.
- Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84: 505-507.
- Crumpacker, D. B., Alexander, J., Cresswell, P., and Engelhard, V. H. 1992. Role of endogenous peptides in murine allogenic cytotoxic T cell responses assessed using transfectants of the antigen-processing mutant 174xCEM.T2. *J Immunol* 148: 3004-3011.
- Dausset J. 1958. Iso-leuco-anticorps, *Acta Haemat.* 20, pp. 156-166.
- Daniel, C., A. Grakoui et P. M. Allen. 1998a. Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J Immunol* 160: 3244-3250.
- Daniel, C., S. Horvath et P. M. Allen. 1998b. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 8: 543-552.
- Delaney, J. R., Y. Sykulev, H. N. Eisen et S. Tonegawa. 1998. Differences in the level of expression of class I major histocompatibility complex proteins on thymic epithelial and dendritic cells influence the decision of immature thymocytes between positive and negative selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5235-5240.
- Demotz, S., Grey, H. M., and Sette, A. 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science* 249: 1028-1030.
- Dittel, B. N., D. B. Sant'Angelo et C. A. Janeway Jr. 1997. Peptide antagonists inhibit proliferation and the production of IL-4 and/or IFN-gamma in T helper 1, T helper 2, and T helper 0 clones bearing the same TCR. *J Immunol* 158: 4065-4073.
- Evavold, B. D., Williams, S. G., Hsu, B. L., Buus, S., and Allen, P. M. 1992. Complete dissection of the Hb(64-76) determinant using T helper 1, T helper 2 clones, and T cell hybridomas. *J Immunol* 148: 347-353.
- Fink, P. J., Matis, L. A., McElligott, D. L., Bookman, M., and Hedrick, S. M. 1986.

- Correlations between T-cell specificity and the structure of the antigen receptor. *Nature* 321: 219-226.
- Frelinger, J. A. et M. McMillan. 1996. The role of peptide specificity in MHC class I-restricted allogeneic responses. *Immunol Rev* 154: 45-58.
- Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, P. Murrack et J. Kappler. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272: 1001-1004.
- Gautam, A. M., Pearson, C., Quinn, V., McDevitt, H. O., and Milburn, P. J. 1995. Binding of an invariant-chain peptide, CLIP, to I-A major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 335-339.
- Goldrath, A. W. et M. J. Bevan. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402: 255-262.
- Gore. 1936.
- Gorer, P. A. 1937. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J Pathol Bacteriol* 44: 691-697.
- Gorga, J. C., Horejsi, V., Johnson, D. R., Raghupathy, R., and Strominger, J. L. 1987. Purification and characterization of class II histocompatibility antigens from a homozygous human B cell line. *J Biol Chem* 262: 16087-16094.
- Grakoui, A., L. F. VanDyk, S. F. Dowdy et P. M. Allen. 1998. Molecular basis for the lack of T cell proliferation induced by an altered peptide ligand. *Int Immunol* 10: 969-979.
- Guesdon, J. L., Ternynck, T., and Avrameas, S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 27: 1131-1139.
- Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A. L., Appella, E., and Engelhard, V. H. 1992. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255: 1261-1263.
- Ignatowicz, L., Kappler, J., and Murrack, P. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 84: 521-529.
- Janeway . 1997.
- Jones, E. Y. 1997. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 9: 75-79.
- Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S. G., and Trowsdale, J. 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 353: 571-573.
- Kisielow, P. and von Boehmer, H. 1995. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol* 58: 87-209.

- Kuzushima, K., R. Sun, G. M. van Bleek, Z. Vegh et S. G. Nathenson. 1995. The role of self peptides in the allogeneic cross-reactivity of CTLs. *J Immunol* 155: 594-601.
- Kvist, S., Wiman, K., Claesson, L., Peterson, P. A., and Dobberstein, B. 1982. Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* 29: 61-69.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lechler, R. I., G. Lombardi, J. R. Batchelor, N. Reinsmoen et F. H. Bach. 1990. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 11: 83-88.
- Lerner, E. A., Matis, L. A., Janeway, C. A. Jr, Jones, P. P., Schwartz, R. H., and Murphy, D. B. 1980. Monoclonal antibody against an Ir gene product? *J Exp Med* 152: 1085-1101.
- Little, C. C., Tyzzer, E.E. 1916. Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a transplantable tumor, carcinoma (JWA) of the Japanese waltzing mouse. *J. Med. Res.* 33, 393-453.
- Little, A. M. and Parham, P. 1999. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet* 1: 105-123.
- Lombardi, G., L. Barber, S. Sidhu, J. R. Batchelor et R. I. Lechler. 1991. The specificity of alloreactive T cells is determined by MHC polymorphisms which contact the T cell receptor and which influence peptide binding. *Int Immunol* 3: 769-775.
- Lombardi, G., S. Sidhu, J. R. Batchelor et R. I. Lechler. 1989. Allorecognition of DR1 by T cells from a DR4/DRw13 responder mimics self-restricted recognition of endogenous peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4190-4194.
- Lorenz, R. and Allen, P. M. 1988a. Processing and presentation of self proteins. *Immunol Rev* 106: 115-127.
- Lorenz, R. G. and Allen, P. M. 1988b. Direct evidence for functional self-protein/Ia-molecule complexes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5220-5223.
- Luescher, I. F., Allen, P. M., and Unanue, E. R. 1988. Binding of photoreactive lysozyme peptides to murine histocompatibility class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 871-874.
- Luescher, I. F., Crimmins, D. L., Schwartz, B. D., and Unanue, E. R. 1990. The sites in the I-Ak histocompatibility molecule photoaffinity labeled by an immunogenic lysozyme peptide. *J Biol Chem* 265: 11177-11184.
- Luescher, I. F. and Unanue, E. R. 1990. Purification and photoaffinity labeling of the I-

- Ak histocompatibility molecule. *J Immunol Methods* 135: 233-245.
- Madden, D. R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 13: 587-622.
- Malarkannan, S., M. Afkarian et N. Shastri. 1995. A rare cryptic translation product is presented by Kb major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells. *J Exp Med* 182: 1739-1750.
- Malarkannan, S., F. Gonzalez, V. Nguyen, G. Adair et N. Shastri. 1996. Alloreactive CD8+ T cells can recognize unusual, rare, and unique processed peptide/MHC complexes. *J Immunol* 157: 4464-4473.
- Malcherek, G., Gnau, V., Jung, G., Rammensee, H. G., and Melms, A. 1995. Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules. *J Exp Med* 181: 527-536.
- Marelli-Berg, F. M., L. Frasca, N. Imami, G. Lombardi et R. I. Lechler. 1999. Lack of T cell proliferation without induction of nonresponsiveness after antigen presentation by endothelial cells. *Transplantation* 68: 280-287.
- Marrack, P., Ignatowicz, L., Kappler, J. W., Boymel, J., and Freed, J. H. 1993. Comparison of peptides bound to spleen and thymus class II. *J Exp Med* 178: 2173-2183.
- Matis, L. A., Cron, R., and Bluestone, J. A. 1987. Major histocompatibility complex-linked specificity of gamma delta receptor-bearing T lymphocytes. *Nature* 330: 262-264.
- Matsumura, M., Fremont, D. H., Peterson, P. A., and Wilson, I. A. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257: 927-934.
- Matzinger, P. and Bevan, M. J. 1977. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol* 29: 1-5.
- Mendoza, L. M., P. Paz, A. Zuberi, G. Christianson, D. Roopenian et N. Shastri. 1997. Minors held by majors: the H13 minor histocompatibility locus defined as a peptide/MHC class I complex. *Immunity* 7: 461-472.
- Merkenschlager, M., Ikeda, H., Wilkinson, D., Beverly, P. C., Trowsdale, J., Fisher, A. G., and Altmann, D. M. 1991. Allorecognition of HLA-DR and -DQ transfectants by human CD45RA and CD45R0 CD4 T cells: repertoire analysis and activation requirements. *Eur J Immunol* 21: 79-88.
- Miyazaki, M., Tsuboi, S., Mihara, K., Kosaka, T., Fukaya, K., Kino, K., Mori, M., and Namba, M. 1996. Establishment and characterization of a human colon cancer cell line, OUMS-23, from a patient with familial adenomatous polyposis. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 95-101.

- Murphy, B., K. S. Kim, R. Buelow, M. H. Sayegh et W. W. Hancock. 1997. Synthetic MHC class I peptide prolongs cardiac survival and attenuates transplant arteriosclerosis in the Lewis-->Fischer 344 model of chronic allograft rejection. *Transplantation* 64: 14-19.
- Nelson, C. A. and Fremont, D. H. 1999. Structural principles of MHC class II antigen presentation. *Rev Immunogenet* 1: 47-59.
- Nelson, C. A., S. J. Petzold et E. R. Unanue. 1993. Identification of two distinct properties of class II major histocompatibility complex-associated peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1227-1231.
- Nelson, C. A., Petzold, S. J., and Unanue, E. R. 1994. Peptides determine the lifespan of MHC class II molecules in the antigen-presenting cell. *Nature* 371: 250-252.
- Nelson, C. A., R. W. Roof, D. W. McCourt et E. R. Unanue. 1992. Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7380-7383.
- Nelson, C. A., N. J. Viner et E. R. Unanue. 1996. Appreciating the complexity of MHC class II peptide binding: lysozyme peptide and I-Ak. *Immunol Rev* 151: 81-105.
- Nordeng, T. W. and Bakke, O. 1994. The bio-logical role of invariant chain (Ii) in MHC class II antigen presentation. *Immunol Lett* 43: 47-55.
- Ozato, K., Hansen, T. H., and Sachs, D. H. 1980. Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. II. Antibodies to the H- 2Ld antigen, the products of a third polymorphic locus of the mouse major histocompatibility complex. *J Immunol* 125: 2473-2477.
- Panina-Bordignon, P., G. Corradin, E. Roosnek, A. Sette et A. Lanzavecchia. 1991. Recognition by class II alloreactive T cells of processed determinants from human serum proteins. *Science* 252: 1548-1550.
- Pieters, J. 1997a. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 9: 89-96.
- Pieters, J. 1997b. MHC class II compartments: specialized organelles of the endocytic pathway in antigen presenting cells. *Biol Chem* 378: 751-758.
- Qiu, Y., Xu, X., Wandinger-Ness, A., Dalke, D. P., and Pierce, S. K. 1994. Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II. *J Cell Biol* 125: 595-605.
- Quill, H., Carlson, L., Fox, B. S., Weinstein, J. N., and Schwartz, R. H. 1987. Optimization of antigen presentation to T cell hybridomas by purified Ia molecules in planar membranes. Ia molecule polymorphism determines the antigenic fine specificity of the response to cytochrome c peptides. *J Immunol Methods* 98: 29-41.

- Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanoviic, S. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228.
- Reay, P. A., Wettstein, D. A., and Davis, M. M. 1992. pH dependence and exchange of high and low responder peptides binding to a class II MHC molecule. *EMBO J* 11: 2829-2839.
- Revilla, Y., Ferreira, A., Villar, M. L., Bootello, A., and Gonzalez-Parque, P. 1986. Studies on the quaternary structure of class I major histocompatibility complex antigens. Effect of different agents on the interaction between subunits. *J Biol Chem* 261: 6486-6491.
- Rhodes, D. A. and Trowsdale, J. 1999. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet* 1: 21-31.
- Riberdy, J. M., Newcomb, J. R., Surman, M. J., Barbosa, J. A., and Cresswell, P. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360: 474-477.
- Rogers, N. J. and Lechler, R. I. 2001. Allorecognition. *Amer J Transplant* 1: 97-102.
- Rotzschke, O., K. Falk, S. Faath et H. G. Rammensee. 1991. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J Exp Med* 174: 1059-1071.
- Sanderson, S., K. Frauwirth et N. Shastri. 1995. Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7217-7221.
- Sanderson, S. et N. Shastri. 1994. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int Immunol* 6: 369-376.
- Sayegh, M. H. et C. B. Carpenter. 1996. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol* 13: 221-229.
- Schlueter, C. J., T. C. Manning, B. A. Schodin et D. M. Kranz. 1996. A residue in the center of peptide QL9 affects binding to both Ld and the T cell receptor. *J Immunol* 157: 4478-4485.
- Snell, G. D. 1948. Methods in the study of histocompatibility genes. *J Genet* 49: 87-103.
- Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368: 215-221.
- Sugawara, S., Abo, T., and Kumagai, K. 1987. A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J Immunol Methods* 100: 83-90.

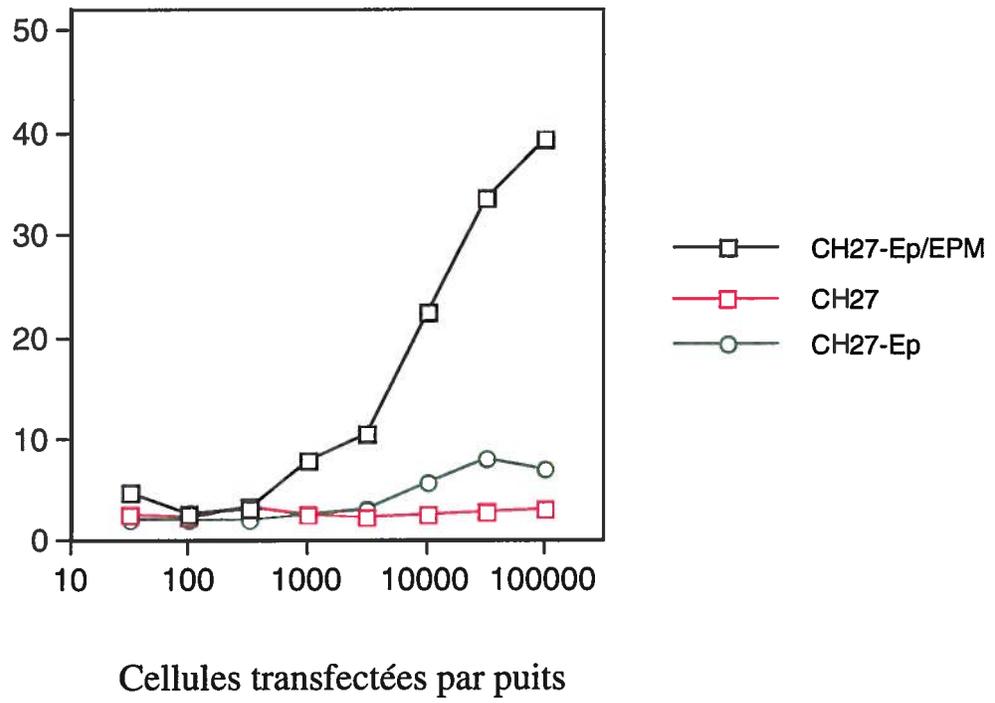
- Sung, E. and Jones, P. P. 1981. The invariant chain of murine Ia antigens: its glycosylation, abundance and subcellular localization. *Mol Immunol* 18: 899-913.
- Tallquist, M. D. et L. R. Pease. 1995. Alloreactive 2C T cells recognize a self peptide in the context of the mutant Kb_{m3} molecule. *J Immunol* 155: 2419-2426.
- Turkewitz, A. P., Sullivan, C. P., and Mescher, M. F. 1983. Large-scale purification of murine I-A_k and I-E_k antigens and characterization of the purified proteins. *Mol Immunol* 20: 1139-1147.
- Udaka, K., T. J. Tsomides et H. N. Eisen. 1992. A naturally occurring peptide recognized by alloreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in association with a class I MHC protein. *Cell* 69: 989-998.
- Vella, J. P., C. Magee, L. Vos, K. Womer, H. Rennke, C. B. Carpenter, W. Hancock et M. H. Sayegh. 1999. Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation* 67: 1523-1532.
- Vella, J. P., M. Spadafora-Ferreira, B. Murphy, S. I. Alexander, W. Harmon, C. B. Carpenter et M. H. Sayegh. 1997. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* 64: 795-800.
- Vidal, K., C. Daniel, I. Vidavsky, C. A. Nelson et P. M. Allen. 2000. Hb(64-76) epitope binds in different registers and lengths to I-E_k and I-A_k. *Mol Immunol* 37: 203-212.
- Vignali, D. A., Doyle, C., Kinch, M. S., Shin, J., and Strominger, J. L. 1993. Interactions of CD4 with MHC class II molecules, T cell receptors and p56lck. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 342: 13-24.
- Vignali, D. A. and Strominger, J. L. 1994. Amino acid residues that flank core peptide epitopes and the extracellular domains of CD4 modulate differential signaling through the T cell receptor. *J Exp Med* 179: 1945-1956.
- Vignali, D. A., Urban, R. G., Chicz, R. M., and Strominger, J. L. 1993. Minute quantities of a single immunodominant foreign epitope are presented as large nested sets by major histocompatibility complex class II molecules. *Eur J Immunol* 23: 1602-1607.
- Viner, N. J., Nelson, C. A., and Unanue, E. R. 1995. Identification of a major I-E_k-restricted determinant of hen egg lysozyme: limitations of lymph node proliferation studies in defining immunodominance and crypticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2214-2218.
- Viret, C. and Janeway, C. A. Jr. 1999. MHC and T cell development. *Rev Immunogenet* 1: 91-104.

- Watts, T. H., Brian, A. A., Kappler, J. W., Marrack, P., and McConnell, H. M. 1984. Antigen presentation by supported planar membranes containing affinity-purified I-Ad. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 7564-7568.
- Wecker, H. and Auchincloss, H. Jr. 1992. Cellular mechanisms of rejection. *Curr Opin Immunol* 4: 561-566.
- Weenink, S. M. and Gautam, A. M. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol* 75: 69-81.
- Wei, B. Y., H. Cao, S. Pan et C. S. David. 1996. Sequence analysis of MHC class II Eb cDNAs from H2r and H2p haplotypes. *Immunogenetics* 44: 231-232.
- Wettstein, D. A., Boniface, J. J., Reay, P. A., Schild, H. And Davis, M. M. 1991. Expression of a class II major histocompatibility complex (MHC) heterodimer in a lipid-linked form with enhanced peptide/soluble MHC complex formation at low pH. *J Exp Med.* 174(1):219-28.

ANNEXES

Annexe 1: Génération d'une lignée cellulaire exprimant de façon constitutive des complexes CMH II I-E^P/EPM : CH27-E^PÆEPM. Les cellules CH27-E^P/EPM sont des lymphomes de cellules B exprimant de façon naturelle la molécule du CMH de classe II I-E^k et qui ont été transfectées avec la chaîne β de la molécule du CMH de classe II I-E^P ainsi qu'avec une construction permettant l'expression constitutive de l'allomimotope EPM. Ces cellules expriment donc une densité élevée de complexes du CMH de classe II I-E^P/EPM. L'habileté à stimuler la cellule T 2.102 a été vérifiée par un test d'activation d'hybridome. La production d'IL-2 a été évaluée à l'aide de la lignée cellulaire dépendante de l'IL-2 CTLL (Lamontagne et Daniel, données non publiées).

Prolifération des CTLL (CPM x 10⁻³)



Annexe 2 : Test d'activation d'hybridomes à partir de complexes du CMH de classe II I-E^p purifiés. Les complexes purifiés I-E^p/peptide à partir des cellules CH27-E^p/EPM ont été testés pour leur habilité à stimuler l'hybridome T 2.102. Les complexes du CMH de classe II ont été élués dans le tampon Tris pH 10.5 contenant les détergents MEGA-8, MEGA-9 et du NaCl. Les complexes purifiés du CMH de classe II ont ensuite été distribués dans les puits d'un plateau 96 puits à différentes dilutions et en triplicata, et incubés pendant 16 h à la température de la pièce. Les plateaux ont ensuite été lavés avec du RPMI, les cellules T 2.102 ont été ajoutées (5×10^4 cellules /puits) et la culture cellulaire a été incubée pendant 18-24 h à 37°C dans une atmosphère 5 % CO₂. L'anticorps 14.4.4s (1 µg/ml) a été ajouté dans certains puits. La production d'IL-2 par l'activation de hybridome T 2.102 a été vérifiée en utilisant la lignée cellulaire dépendante pour l'IL-2, CTLL-2. (Hébert et Daniel, données non publiées).

