

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Identification et caractérisation des alloptides naturels
reconnus par la cellule T 2.102**

Par
Caroline Hébert

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

Jury d'évaluation

Examineur interne : Veronika Von Messling
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe : Michel Desjardins
Université de Montréal

Directeur de recherche : Claude Daniel
INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

La réponse allogénique est caractérisée par une fréquence élevée de précurseurs de cellules T capables de reconnaître les molécules du CMH allogéniques. En effet, 1 à 10% des cellules T périphériques répondent aux alloantigènes, ce qui s'avère être un obstacle majeur aux transplantations. Il a été démontré que les peptides du soi associés aux molécules du CMH jouent un rôle crucial dans l'alloréactivité. Les progrès réalisés sur l'identification et la caractérisation de ces peptides ont jusqu'ici été principalement réalisés sur des systèmes impliquant des molécules du CMH I. L'absence d'un système de CMH II soi/alloréactivité limite nos connaissances sur les mécanismes moléculaires d'interaction TCR-peptide-CMH du soi vs TCR-peptide-CMH alloréactif.

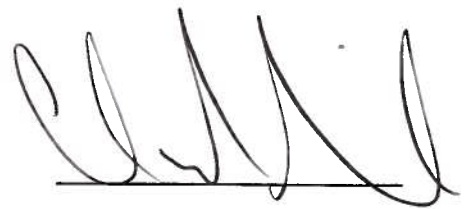
Un modèle d'étude du rejet de greffe utilisant diverses souris transgéniques a donc été mis au point dans notre laboratoire. Dans ce cadre, notre modèle CMH II est basé sur le clone de cellule T $CD4^+$ 2.102. Ce clone est spécifique au peptide de l'hémoglobine Hb(64-76) lorsque présenté par une molécule du CMH II I-E^k du soi. La cellule T 2.102 est également alloréactive contre la molécule du CMH II I-E^p où le ou les peptides naturels présentés ne sont pas encore connus. L'objectif de ce projet est d'identifier et de caractériser ces peptides naturels à l'aide d'une purification des molécules du CMH II par chromatographie d'affinité et la caractérisation des peptides associés aux molécules.

Les complexes CMH II I-E^p/peptide ont été purifiés par chromatographie d'affinité à partir de la lignée cellulaire CH27-E^p-EPM. Cette lignée cellulaire exprime constitutivement les complexes CMH II I-E^p/peptide EPM. Le peptide EPM, généré suite au criblage d'une banque peptidique combinatoire, a été utilisé pour valider la méthode. Une fois les complexes CMH II I-E^p/peptide purifiés, les peptides ont été dissociés des molécules du CMH II par traitement acide puis séparés par HPLC. Nous avons démontré que certaines fractions d'HPLC peuvent reconstituer l'alloréactivité de la cellule T 2.102. En particulier, les fractions obtenues à 50,5, 58 et 64 minutes sont celles capables de stimuler le plus fortement la cellule T 2.102. Ces fractions ont été analysées par

spectrométrie de masse. Deux peptides ont été identifiés dans les fractions à 50,5 min et 64 min. Le premier correspond aux 13 acides aminés de l'épitope EPM. Le second peptide correspond aux 13 acides aminés de l'épitope EPM additionné d'une glycine et d'une sérine à l'extrémité C-terminale. Ces deux derniers résidus proviennent des acides aminés encodés dans la cassette d'expression du vecteur utilisé pour la transfection des cellules CH27-E^p-EPM. Les expériences pourront être effectuées avec la lignée cellulaire CH27-E^p afin d'identifier et de caractériser les peptides naturels capables de reconstituer l'alloréactivité de la cellule T 2.102.



Caroline Hébert



Claude Daniel

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Claude Daniel pour son soutien et sa confiance. Merci à nos collaborateurs tels que le Dr. Claude Dupont et Roger Dubuc pour le prêt de leur HPLC ainsi que pour leur indispensable expertise et le Dr. François Lépine pour son aide précieux avec les analyses en spectrométrie de masse

J'aimerais remercier mes collègues de travail et amis tout particulièrement Caroline qui m'a épaulée tout au long de ma maîtrise. Bon courage au Doctorat :P Il ne faut surtout pas oublier ma famille qui a toujours été là autant dans les bons moments que dans les moments difficiles. Finalement, merci à Marco sans qui je ne serais probablement pas rendue où je suis aujourd'hui.

Merci à tous !

TABLE DES MATIÈRES

<u>RÉSUMÉ</u>	<u>I</u>
<u>REMERCIEMENTS</u>	<u>III</u>
<u>TABLE DES MATIÈRES</u>	<u>IV</u>
<u>LISTE DES FIGURES</u>	<u>VII</u>
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	<u>IX</u>
<u>LISTE DES ANNEXES</u>	<u>X</u>
<u>LISTE DES ABRÉVIATIONS</u>	<u>XI</u>
<u>INTRODUCTION</u>	<u>1</u>
<u>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	<u>3</u>
<u>1. Historique</u>	<u>4</u>
<u>2. Les deux classes de molécules du CMH</u>	<u>7</u>
2.1 Les molécules du CMH de classe I	7
2.2. Les molécules du CMH de classe II	8
<u>3. Les structures des molécules du CMH de classe I et II</u>	<u>9</u>
3.1 La structure des molécules du CMH de classe I	9
3.2 La structure des molécules du CMH de classe II	10
3.2.1 Les interactions du peptide avec la niche peptidique	12
3.2.2 Liaison entre les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$	15
3.2.3 Reconnaissance de la molécule du CMH par le TCR	17
<u>4. La voie d'apprêtement et de présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II</u>	<u>18</u>
4.1 L'entrée des antigènes exogènes	18
4.2 L'assemblage des molécules du CMH de classe II	20
4.3 La chaîne invariante (Ii) ou CD74	20
4.4 Le fragment CLIP	21
4.5 La molécule DM	21
4.6 La molécule HLA-DO	22
<u>5. L'expression à la surface de la cellule</u>	<u>23</u>
<u>6. La cinétique de la présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II</u>	<u>23</u>

<u>7. La polygénie et le polymorphisme des molécules du CMH de classe II</u>	<u>24</u>
<u>8. La stabilité de la molécule du CMH de classe II</u>	<u>26</u>
<u>9. La purification et la caractérisation des molécules du CMH de classe II et leurs peptides</u>	<u>27</u>
<u>10. Pourquoi identifier des épitopes présentés par les molécules du CMH I et II ?</u>	<u>28</u>
<u>11. L'alloréactivité</u>	<u>31</u>
<u>12. Les modèles d'études</u>	<u>32</u>
12.1 Le modèle de la cellule T 2.102	33
<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	<u>35</u>
<u>1. Cellules</u>	<u>36</u>
1.1 Lignées cellulaires	36
1.2 Cultures cellulaires.....	37
<u>2. Production et purification d'anticorps monoclonaux</u>	<u>38</u>
2.1 Production de surnageant	38
2.2 Purification des anticorps.....	38
2.3 Dosage des anticorps purifiés	39
2.4 Électrophorèse de protéines (SDS-PAGE)	39
2.5 Coloration des protéines.....	40
<u>3. Production et purification de complexes CMH de classe II murin I-E^k et I-E^p</u>	<u>40</u>
3.1 Préparation de l'immunoabsorbant	40
3.2 Solubilisation de l'antigène.....	41
3.3 Purification des complexes I-E ^k et I-E ^p	41
3.4 Dosage des complexes I-E ^k et I-E ^p purifiés.....	42
<u>4. Séparation des peptides obtenus à partir des complexes I-E^k et I-E^p purifiés</u>	<u>42</u>
4.1 Récupération des peptides associés aux molécules du CMH II I-E ^k et I-E ^p	42
4.2 Séparation des peptides purifiés par HPLC	43
<u>5. Analyse de la stabilité des complexes CMH de classe II</u>	<u>43</u>
5.1 Immunoprécipitation.....	43
5.2 Immunoempreinte de type « Western »	44
5.2.1 Préparation de l'échantillon.....	44
5.2.2 Transfert des protéines sur la membrane	44
5.2.3 Révélation	45
<u>6. Analyse de l'activation de l'hybridome T 2.102 par les complexes CMH de classe II</u>	<u>45</u>
6.1 Test d'activation des hybridomes T	45
6.2 Criblage des fractions d'HPLC	46
<u>7. Analyse en spectrométrie de masse des peptides purifiés</u>	<u>46</u>

<u>RÉSULTATS</u>	<u>48</u>
<u>1. La purification des molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^p</u>	<u>49</u>
<u>2. La stabilité des complexes CMH II/peptide</u>	<u>52</u>
<u>3. Activation des hybridomes T 2.102 par les complexes CMH II I-E^p /peptide purifiés</u>	<u>54</u>
<u>4. Analyse des profils des chromatogrammes d'HPLC</u>	<u>56</u>
<u>5. Criblage des fractions obtenues par HPLC capables de stimuler l'hybridome T 2.102</u>	<u>58</u>
<u>6. Analyses de spectrométrie de masse</u>	<u>62</u>
<u>DISCUSSION</u>	<u>66</u>
<u>1. Identification de l'épitope EPM à partir de la lignée cellulaire CH27-E^p-EPM</u>	<u>67</u>
<u>2. Perspectives du projet à court terme</u>	<u>70</u>
2.1 Reprise des expériences avec CH27-E ^p par l'approche protéomique.....	70
2.2. Expérience avec un protocole modifié.....	71
2.3 Confirmation de la présence des alloptides <i>in vivo</i>	72
<u>CONCLUSION</u>	<u>73</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>75</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>85</u>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arrangement des gènes du CMH de classe I et II humain et murin	p.6
Figure 2 : Structure des molécules du CMH de classe I et II	p.11
Figure 3 : Superposition des structures de la molécule du CMH II murin (I-A ^k et I-E ^k) et CMH II humain (HLA-DR)	p.13
Figure 4 : Les liaisons hydrogènes entre la molécule du CMH II I-A ^k et le peptide HEL	p.16
Figure 5 : Schématisation simplifiée de la biosynthèse des molécules du CMH II	p.19
Figure 6 : Histogrammes de variabilité des séquences peptidiques des molécules du CMH de classe I et classe II	p.25
Figure 7 : Modèle d'alloréactivité de la cellule T 2.102	p.34
Figure 8 : Purification des complexes CMH II I-E ^k /peptide et/ou CMH II I-E ^p /peptide par chromatographie d'affinité	p.51
Figure 9 : Détection des complexes CMH II I-E ^k /peptide et I-E ^p /peptide purifiés par immunoempreinte de type « Western »	p.53
Figure 10 : Activation des hybridomes T 2.102 par les complexes CMH II I-E ^p /peptide purifiés	p.55
Figure 11 : Analyses par HPLC des peptides associés au CMH II obtenus à partir de différentes lignées cellulaires	p.57

Figure 12 : Criblage des fractions d'HPLC possédant une activité stimulatrice des hybridomes T 2.102**p.60-61**

Figure 13 : Analyse par spectrométrie de masse de la fraction d'HPLC à 50,5 min**p.63**

Figure 14 : Analyse par spectrométrie de masse de la fraction d'HPLC à 58 min**p.64**

Figure 15 : Analyse par spectrométrie de masse de la fraction d'HPLC à 64 min**p.65**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les molécules du CMH II I-E exprimées sur les différentes lignées cellulaires	p.37
--	-------------

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression de la chaîne α de I-E^k à la surface des cellules COS-7 transfectées en fusion avec la chaîne invariante**p.86**

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2-ME	:	2-β-mercaptoéthanol
Ag	:	antigène
CBS	:	Calf bovine serum
CLIP	:	peptide de la chaîne invariante associée aux molécules CMH II
CMH	:	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	:	cellule présentatrice d'antigène
CPM	:	compte par minute
°C	:	degré celcius
D.O.	:	densité optique
FCS	:	Fetal calf serum
FITC	:	fluorescéine isothiocyanate
g	:	force gravitationnelle
g	:	gramme
Hb	:	hémoglobine
HEL	:	hen egg white lysozyme
HEPES	:	hydroxyethylpiperazine-N-2'-ethane-sulfonic acide
HLA	:	human leucocytes antigen
HPLC	:	high-performance-liquid-chromatography
Ii	:	chaîne invariante associée aux molécules CMH II
IgG	:	Immunoglobuline d'isotype G
L	:	litre
M	:	molaire
MEGA-8	:	octanoyl-N-methyl glutamide
MEGA-9	:	nonanoyl-N-methyl glutamide
mg	:	milligramme
min	:	minute
mL	:	millilitre
mM	:	millimolaire
ms/ms	:	Tandem mass spectrometry

m/z	:	masse/charge
PBS	:	phosphate-buffered saline
PCR	:	réaction de polymérisation en chaîne
pmol	:	picomole
PMSF	:	phenylmethysulfonyl fluoride
p/v :		poids/volume
RE	:	réticulum endoplasmique
SA-HRP	:	streptavidine-horseradish peroxidase
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	:	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
TCR	:	T-cell-receptor
TFA	:	acide trifluoroacétique
μL	:	microlitre
v/v	:	volume/volume

INTRODUCTION

Les molécules du CMH jouent un rôle très important dans la réponse immunitaire. Depuis plusieurs années, les chercheurs ont vu dans les peptides présentés par les molécules du CMH un potentiel intéressant pour le développement de vaccins ou d'approches thérapeutiques et ce, pour les cancers, les maladies autoimmunes ou le rejet de greffe d'organe. Nous savons que la réponse allogénique est caractérisée par une fréquence élevée de précurseurs de cellules T capables de reconnaître les molécules du CMH allogéniques, ce qui s'avère être un obstacle majeur aux transplantations (1).

Les peptides du soi liés aux molécules du CMH sont fortement impliqués dans l'alloréactivité. Les progrès sur l'identification et la caractérisation de ces peptides ont jusqu'à présent été principalement réalisés sur des systèmes impliquant des molécules du CMH I (2-4). Compte tenu du faible nombre d'informations disponibles sur l'alloréactivité des molécules du CMH de classe II et l'implication des peptides qui y sont présentés, notre laboratoire a mis au point un modèle d'étude du rejet de greffe pour nous aider à mieux comprendre l'alloréactivité. Il est basé sur le clone de cellule T CD4⁺ 2.102 (5). Ce clone est spécifique au peptide de l'hémoglobine Hb(64-76) lorsque présenté par une molécule du CMH II I-E^k du soi et est également alloréactif contre la molécule du CMH II I-E^p où le ou les peptides naturels présentés ne sont pas encore connus. Étant donné que le mode d'interaction entre les cellules alloréactives et les molécules du CMH est encore inconnu, l'identification et la caractérisation des ligands des cellules T alloréactives permettrait d'augmenter nos connaissances au niveau des bases moléculaires de l'alloréactivité ainsi que mieux comprendre comment ils peuvent influencer les alloréponses *in vivo*.

L'objectif de ce projet était d'identifier et de caractériser ces peptides naturels par une approche protéomique. Les complexes CMH II I-E^p/peptide ont d'abord été purifiés par chromatographie d'affinité. Par la suite, les peptides naturels ont été dissociés des molécules du CMH II puis séparés par HPLC. Finalement, les peptides capables de stimuler la cellule T 2.102 ont été analysés par spectrométrie de masse.

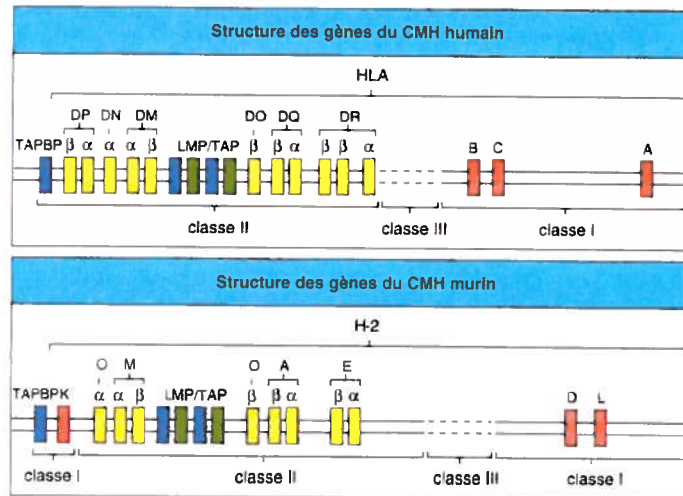
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Historique

Les vertébrés ont développé un système de défense adapté pour lutter contre les microorganismes pathogènes et le cancer que l'on appelle système immunitaire. Le système immunitaire a pour fonction de permettre à un organisme pluricellulaire de maintenir la cohérence des cellules et des tissus qui le constituent. Il doit également assurer son intégrité en éliminant ses propres constituants qui ont été altérés et les substances étrangères auxquels ils sont exposés. Les macrophages et les neutrophiles du système immunitaire naturel représentent la première ligne de défense contre de nombreux microorganismes communs et sont indispensables pour des infections bactériennes courantes. Cependant, ils échouent parfois, ce sont donc les lymphocytes T du système immunitaire adaptatif qui ont évolué pour fournir un moyen de défense plus élaboré. Le système immunitaire adaptatif des vertébrés est alerté lorsqu'il y a présence d'une infection. Les peptides antigéniques sont présentés à la surface des cellules en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les complexes CMH/peptide seront alors reconnus par les cellules T et engageront par un TCR hautement spécifique, l'initiation de la réponse immunitaire (6, 7).

Les molécules du CMH jouent donc un rôle très important dans la réponse immunitaire. L'étude des molécules du CMH a commencé au début des années 1900 par les analyses de tumeurs transplantées entre souris. Il a été démontré en 1916 que différents gènes dominants semblaient avoir un impact sur les greffes de tumeurs allogéniques (8). Toutefois, il a été observé qu'il était possible d'effectuer une greffe de peau entre jumeaux identiques, aussi appelée greffe isogénique et ce, sans qu'il y ait rejet de la greffe (9). La poursuite des études sur les facteurs génétiques influençant la transplantation a mené à l'identification du CMH des souris (H-2) en 1937 (10) et la caractérisation de celui-ci en 1948 (11). Quelques années plus tard, le CMH humain a finalement été identifié en analysant les réactions d'agglutination obtenues avec les sérums des sujets immunisés à l'occasion de transfusions sanguines (12).

La surveillance complète de l'environnement cellulaire est effectuée par deux classes de molécules du CMH appelées classe I et classe II. Le complexe majeur d'histocompatibilité est aussi appelé système HLA pour "Human Leucocytes Antigen" car ce sont les différences antigéniques entre les globules blancs de différents individus qui sont à l'origine de leur découverte (13). Les molécules HLA sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, appartenant à la superfamille des immunoglobulines, dont la fonction principale est de présenter les peptides aux cellules T $CD8^+$ pour les CMH I et T $CD4^+$ pour les CMH II (6). Le CMH est un ensemble de plus de 200 gènes s'étendant sur 4 centimorgans d'ADN soit environ 4 millions de paires de base. Les gènes du CMH se situent sur le segment du bras court du chromosome 6 (6p21.3) chez l'humain et sur le chromosome 17 chez la souris (14). Le CMH est constitué de trois familles de gènes comprenant les molécules du CMH I, II et III. Chez l'humain, il y a les molécules de classe I dites classiques qui sont hautement polymorphiques (HLA-A, B, C) et les non-classiques qui le sont moins (HLA-E, F, G). Le CMH de classe II contient environ 25 gènes aussi regroupés en deux principales classes, les classiques (HLA-DR, DP et DQ) qui sont hautement polymorphiques et les non-classiques (HLA-DM et HLA-DO) qui montrent un polymorphisme limité (15). La région du CMH de classe III est définie comme un segment situé entre les régions du CMH I et II et contient une collection de gènes hétérologues qui ont le potentiel d'une fonction immune ou inflammatoire (14). Les molécules du CMH I de souris sont nommées H-2 (K, D et L) alors que les molécules du CMH II sont nommées I-A et I-E (16). La figure 1 représente l'organisation générale des gènes du CMH de l'humain et de la souris. Les combinaisons particulières des allèles du CMH trouvées sur les chromosomes individuels sont connues sous le nom d'haplotype (17).



**Figure 1 : Arrangement des gènes du CMH de classe I et II humain et murin
(Figure tirée de Janeway, 2e Édition, 2001)**

2. Les deux classes de molécules du CMH

Contrairement aux lymphocytes B qui peuvent reconnaître un antigène natif, les lymphocytes T peuvent reconnaître un antigène seulement lorsque celui-ci est présenté par une molécule du CMH. Les deux classes de molécules du CMH sont donc responsables de la présentation de protéines du soi et du non soi aux lymphocytes T (18). Les molécules du CMH vont présenter à la surface des cellules des peptides et des fragments protéiques provenant du cytosol ou du milieu environnant. Ces deux voies sont généralement appelées la voie endogène et la voie exogène. Le CMH a une organisation relativement conservée entre les espèces animales. Il s'agit d'un système multigénique, multiallélique, d'expression codominante (19).

2.1 Les molécules du CMH de classe I

Les molécules du CMH I sont hautement exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées. La présentation d'antigène par les molécules du CMH de classe I est souvent définie comme la voie endogène (15). La voie endogène est celle où des peptides dérivés de protéines résidant dans le cytosol cellulaire vont être présentés par les molécules du CMH I aux cellules T. Les peptides sont normalement issus de pathogènes, souvent des antigènes viraux qui seront reconnus par des cellules T CD8⁺ cytotoxiques, lesquelles sont spécialisées pour tuer les cellules infectées de façon spécifique (20, 21). Les réponses des cellules T sont généralement très efficaces contre des pathogènes restreints à la voie endogène. Les cellules dendritiques infectées par des pathogènes sont d'ailleurs habituellement affectées fonctionnellement. Alors comment les cellules dendritiques peuvent activer les cellules T CD8⁺ cytotoxiques si elles n'expriment pas les antigènes après l'infection? Le modèle classique du CMH I décrivant la voie de présentation endogène d'antigènes semble inadéquat pour entièrement expliquer ce phénomène. Dans les cellules non-hématopoïétiques, le problème de restriction à la voie de présentation du CMH I est critique. En effet, les cellules non-hématopoïétiques saines peuvent devenir des cibles pour les cellules T cytotoxiques étant donné qu'elles ne sont pas des cellules présentatrices d'antigène.. Il y a aurait donc une voie alternative

permettant aux cellules dendritiques et possiblement aux macrophages de présenter les antigènes de cellules infectées ou anormales aux cellules T cytotoxiques facilitant ainsi la génération d'une réponse immunitaire CMH I restreinte. Cette voie, appelée présentation croisée, permet donc la présentation de peptides exogènes dans un contexte de molécules du CMH I donnant ainsi une chance de prévenir la dissémination de pathogènes et la propagation de cellules cancéreuses à travers le système lymphatique (22). Ces dernières années, quelques équipes ont contribué à la compréhension du fonctionnement de la présentation croisée (23, 24).

2.2. Les molécules du CMH de classe II

Autant l'expression des molécules du CMH I est ubiquitaire dans les tissus, autant l'expression des molécules du CMH II est plus restreinte à des cellules données. Les molécules du CMH II sont exprimées seulement sur les cellules présentatrices d'antigène spécialisées telles que les lymphocytes B, les cellules dendritiques (incluant les cellules de Langerhans de la peau), les macrophages tels que les cellules Kupffer dans le foie et les cellules T activées dans la plupart des espèces à l'exception des souris (25, 26). Les molécules du CMH II présentent les peptides aux cellules T CD4⁺. La fonction principale de ces cellules T est de réguler l'activation ou la suppression des autres cellules effectrices du système immunitaire. Ces molécules clés sont critiques pour de nombreux aspects des fonctions immunitaires comme la sélection des cellules T, l'induction de la tolérance, la production d'anticorps, l'immunité médiée par les cellules T et la réponse inflammatoire (27). Les cellules T CD4⁺ vont sécréter une ou plusieurs cytokines appelées interleukines (IL) comme l'IL-2, IL-4, IL-5 ou l'interféron γ qui servent à amplifier la réponse immune globale en contribuant à la prolifération des cellules T et B, l'activation des macrophages ou la différenciation des cellules B (28). Les molécules du CMH II lient des peptides issus de protéines contenus dans les vésicules intracellulaires et présentent ainsi des peptides dérivés de pathogènes vivants dans les vésicules macrophagiques ou ingérés par les cellules phagocytaires et les cellules B. Les molécules du CMH II présentant des peptides dérivés d'antigènes exogènes et présents dans des vésicules seront reconnues par des cellules T (29). Toutefois, il peut arriver que des

peptides naturels présents dans la cellule soient présentés par les molécules du CMH II par la voie endogène, c'est-à-dire des protéines du soi qui ont été dégradées provenant du cytosol (30). Compte tenu de leur rôle de principaux médiateurs du rejet de transplantation, ces molécules sont des cibles pour les thérapies immunitaires dans la prévention des rejets de greffe de tissus et d'organes. Les molécules du CMH II sont également impliquées dans des maladies comme l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque (27).

3. Les structures des molécules du CMH de classe I et II

La percée majeure dans la compréhension de la restriction au CMH et la présentation d'antigène est survenue suite à la première cristallographie à rayons X de la structure de la molécule du CMH I en 1988 (31). La première structure cristallographique de la molécule du CMH II a été publiée 5 ans plus tard (32). La technologie de la cristallographie nous a donc permis d'observer que les structures tridimensionnelles des molécules du CMH I et II sont assez semblables bien que présentant des différences notables. Elles se distinguent par de petites différences mais partagent la plupart de leurs caractéristiques structurales principales. La plus importante de ces similitudes est l'existence de deux domaines extracellulaires qui se combinent pour créer une cavité allongée dans laquelle un fragment peptidique unique capté au cours de la synthèse et de l'assemblage de la molécule du CMH sera présenté à la surface cellulaire. Ce sillon creusé dans lequel une variété de peptides peuvent être fixée s'appelle la niche peptidique (33).

3.1 La structure des molécules du CMH de classe I

Les molécules du CMH I sont composées d'une chaîne lourde α organisée en trois domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ d'approximativement 90 acides aminés de long, d'une partie transmembranaire de 40 acides aminés, d'une courte queue cytoplasmique de 30 acides aminés et d'une chaîne légère invariante, la β_2 -microglobuline (β_2m) (34). La

β_2m est codée par un gène localisé sur le chromosome 15 (35). Elle est située près de la membrane et est associée par un lien non covalent à la molécule. L'étude des séquences indique que la chaîne lourde des molécules du CMH I est une molécule très polymorphique. En effet, la chaîne lourde de 44 kDa est porteuse de la variabilité allélique.

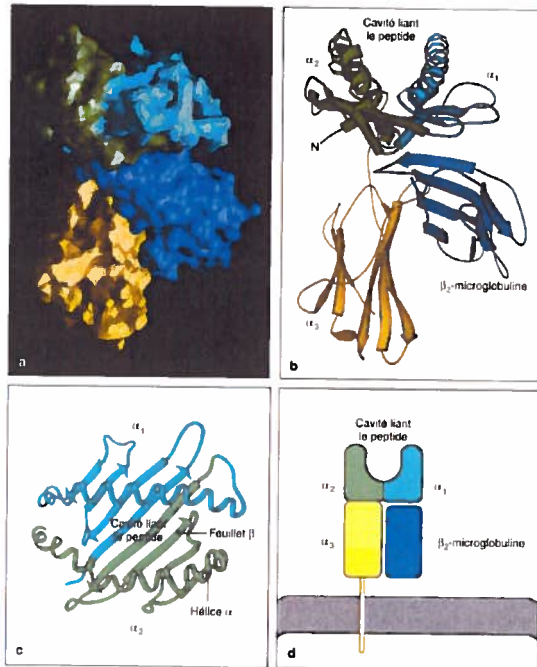
La niche peptidique de la molécule du CMH I est formée des domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$. La niche de la molécule du CMH I est dite fermée puisque les extrémités de la niche sont liées par des interactions avec le peptide empêchant celui-ci d'être plus long que 8 à 10 acides aminés. Les peptides adoptent une conformation allongée le long du sillon. Si les peptides sont un peu plus longs, ils vont former un pli de façon à entrer dans la niche peptidique (Figure 2A, Figure 2C) (17, 36).

3.2 La structure des molécules du CMH de classe II

La molécule du CMH II est composée d'un complexe non covalent de deux chaînes, la chaîne α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et la chaîne β ($\beta 1$ et $\beta 2$). La chaîne α a un poids moléculaire d'environ 33 à 35 kDa et la chaîne β d'environ 25 à 30 kDa (37, 38). Les deux chaînes sont des glycoprotéines membranaires intégrales composées d'une région extracytoplasmique N-terminale divisée en deux domaines de 90 à 100 acides aminés, d'une région transmembranaire de 20 à 25 acides aminés et d'un domaine cytoplasmique court de 12 à 15 acides aminés (28). L'association des domaines N-terminaux $\alpha 1$ et $\beta 1$ avec une plate-forme β et 2 hélices α forment la structure nécessaire à la niche peptidique de la molécule du CMH II. Les deux sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ sont supportées par les domaines $\alpha 2$ et $\beta 2$. La niche peptidique du CMH II est dite ouverte. Les groupes de résidus conservés qui lient les deux extrémités d'un peptide dans la molécule du CMH I sont absents chez la molécule du CMH II. Les extrémités du peptide ne sont donc pas liées. L'ouverture de la niche permet aux molécules du CMH II de lier des peptides plus longs que les CMH I, c'est-à-dire des peptides allant de 10 à 15 acides aminés (Figure 2B, Figure 2D) (6, 17, 39).

CMH I

Figure 2 A



CMH II

Figure 2 B

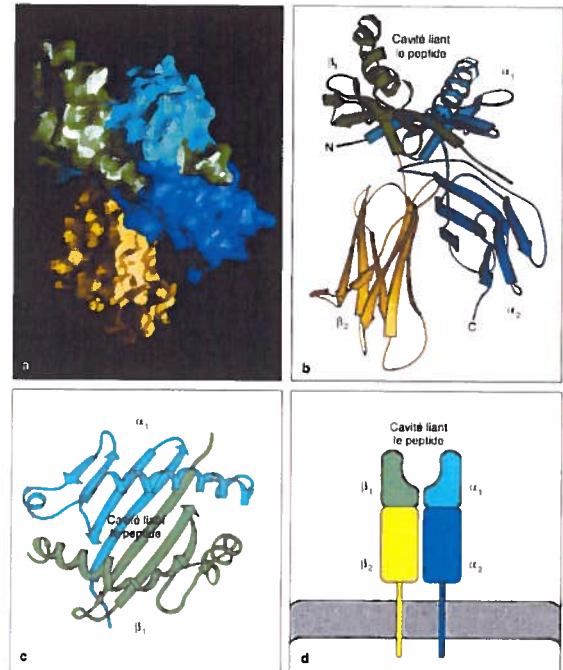


Figure 2 C



Figure 2 D



Figure 2 : Structure des molécules du CMH de classe I et II
(Figures tirées de Janeway, 2e Édition, 2001)

3.2.1 Les interactions du peptide avec la niche peptidique

La niche peptidique des molécules du CMH I et II est composée de deux hélices α formées par deux domaines séparés de la molécule du CMH ce qui se trouve au-dessus d'un plancher composé de huit feuillets β anti-parallèles. Il y a un profond sillon entre les hélices α afin d'accommoder la liaison du peptide. Quatre feuillets β et une hélice α sont dérivés de chacune des sous-unités. L'hélice α de la niche peptidique est formée des résidus 50 à 80 de la chaîne α et des résidus 55 à 90 de la chaîne β (28).

Autant la molécule du CMH II démontre une structure très similaire à la molécule du CMH I en ce qui a trait à sa structure plissée autant ces deux molécules sont différentes aux extrémités du sillon de liaison des peptides. Comme la niche peptidique des molécules du CMH I est dite fermée, la liaison du peptide dans le sillon est stabilisée aux deux extrémités par des interactions entre les atomes des extrémités libres amino et carboxy-terminales du peptide. Le peptide est également maintenu par des groupes de résidus tyrosines communs à toutes les molécules du CMH I formant des ponts hydrogènes avec l'extrémité aminée du peptide. Un autre groupe de résidus forme des ponts hydrogènes et des interactions ioniques avec le squelette du peptide à l'extrémité carboxylée. Les extrémités du sillon de liaison peptidique des molécules du CMH II sont dites ouvertes ce qui permet d'accommoder la liaison de peptides avec les extrémités N-terminales et C-terminales débordant de la niche. Le peptide prend une conformation en hélice polyproline de type II allongée dans le sillon de la molécule du CMH II et est maintenu dans le sillon par les chaînes latérales. Le peptide s'enfonce dans les poches plus ou moins profondes formées par les résidus polymorphes. Des interactions entre le squelette du peptide et les chaînes latérales des acides aminés conservés qui bordent le sillon de liaison du peptide dans toutes les molécules du CMH II maintiennent également le peptide dans le sillon. Les quelques structures cristallographiques existantes de complexes CMH II/peptide montrent que les chaînes latérales des acides aminés 1, 4, 6 et 9 du peptide peuvent être maintenues dans ces poches de liaison. Les poches de liaison les plus profondes et le plus communément utilisées sont P1 et P9 suivies de P4 et P6. La lettre P est utilisée pour désigner point d'ancrage (Figure 3) (17, 19, 36, 40).

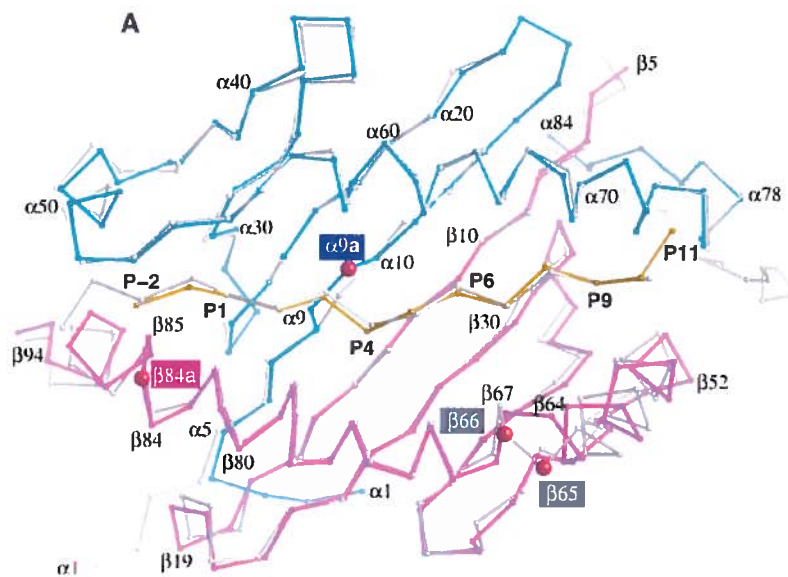


Figure 3 : Superposition des structures de la molécule du CMH II murin (I-A^k et I-E^k) et CMH II humain (HLA-DR)
 (le domaine α₁ en cyan, le domaine β₁ en magenta, le peptide en jaune et les αx et βx représente les positions des résidus sur les différents domaines)
 (Figure tirée de Fremont *et al.*, 1998)

Pour la plupart des molécules du CMH II, l'interaction dominante dans la niche peptidique est de nature hydrophobique. Toutefois, I-A^k est un exemple de molécule du CMH II où l'interaction avec le point d'ancrage dominant P1 est électrostatique (40). HLA-DR et I-E^k sont étroitement apparentées puisque pour ces molécules le polymorphisme est concentré sur la chaîne β . Ce n'est pas le cas pour les autres membres de la famille des molécules du CMH II HLA-DQ, HLA-DP et I-A puisque le polymorphisme se retrouve également sur la chaîne α . Normalement, la liaison de la majorité des peptides se produit entre les chaînes latérales et les résidus d'ancrage clés. Le fait d'identifier quelques résidus critiques à la liaison peptidique nous permet de définir les motifs de liaison du peptide spécifique à un allèle. Par exemple, les peptides pouvant se lier à la molécule I-E^k possèdent une isoleucine, une leucine ou une valine en position P1 et une lysine ou occasionnellement une arginine en P9. Les poches P4 et P6 de I-E^k sont moins restrictives. Habituellement, nous retrouvons un acide aminé hydrophobique en P4 alors qu'il est assez commun de retrouver en P6 une glutamine, un acide glutamique, un acide aspartique ou une arginine. Un bon exemple de peptide pouvant être lié à I-E^k est le peptide de l'hémoglobine composé des acides aminés 64 à 76 (20, 25, 37, 41).

P1	P4	P6	P9
G	K	V	I
T	A	F	N
E	G	L	K

3.2.2 Liaison entre les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$

La liaison entre les chaînes α et β se situe au niveau des domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$. Il a été démontré que certaines positions polymorphiques à l'extrémité N-terminale du domaine $\beta 1$ sont importantes pour la liaison des chaînes α et β . En effet, des mutations aux résidus 9, 12, 13, 14 et 17 amènent une absence complète de l'expression de l'hétérodimère. Il a également été démontré que des mutations à l'extrémité C-terminale du domaine β , par exemple, la position 78 ou 86, entraînent une inhibition de l'expression ou une séquestration de l'hétérodimère dans les compartiments cytoplasmiques (42).

Les deux domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ sont reliés entre eux par un pont salin formé entre les résidus $\alpha 76\text{Arg}$ et $\beta 57\text{Asp}$. La formation de ce lien est importante pour la stabilité de l'hétérodimère $\alpha\beta$. Ces résidus peuvent également interagir avec le squelette du peptide et ce, en position P10, permettant ainsi la formation d'un lien hydrogène près de la région C-terminale du peptide (25, 43). La liaison peptidique avec les molécules du CMH II est caractérisée par des séries de liaisons hydrogènes entre des acides aminés génétiquement conservés et le squelette du peptide. Dans la plupart des structures cristallographiques des molécules du CMH II, ces liaisons hydrogènes se font entre les positions $\alpha 53$, $\alpha 62$, $\alpha 69$ et $\alpha 76$ de la chaîne α et les positions $\beta 57$, $\beta 61$ et $\beta 82$ de la chaîne β . Ces positions sont impliquées dans les liaisons hydrogènes entre la chaîne du peptide et la niche peptidique (Figure 4) (40, 44).

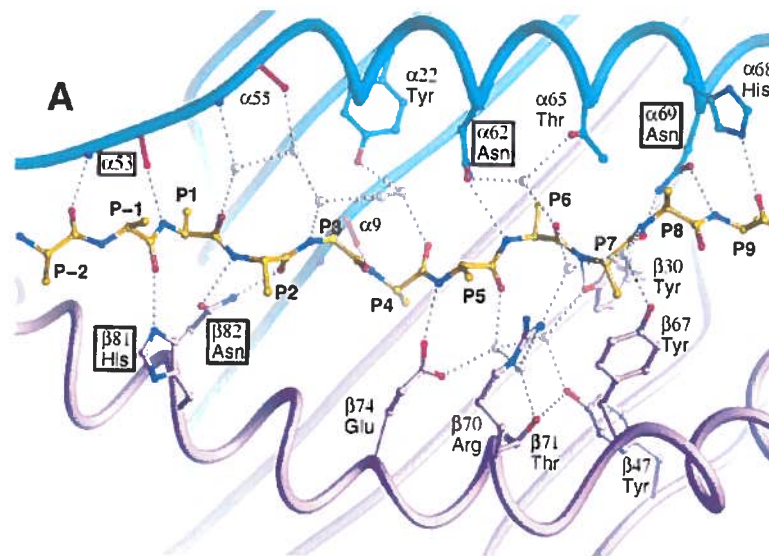


Figure 4 : Les liaisons hydrogènes entre la molécule du CMH II I-A^k et le peptide HEL
 (le domaine α_1 en bleu, le domaine β_1 en magenta et le peptide en jaune)
 (Figure tirée de Fremont *et al.*, 1998)

3.2.3 Reconnaissance de la molécule du CMH par le TCR

Les cellules T expriment à leur surface des récepteurs appelés TCR. Ces récepteurs ressemblent aux immunoglobulines au niveau de leur structure car ils possèdent tous les deux des régions constantes (C) et variables (V). Ils sont également similaires au niveau du mécanisme génétique qui produit leur variabilité génétique. Le rôle du TCR est de reconnaître les antigènes exposés à la surface des cellules par l'intermédiaire des molécules du CMH. La reconnaissance d'un ligand va induire un signal intracellulaire dans la cellule T. Le TCR est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Le CDR1 et le CDR2 sont codés dans les segments de la lignée germinale des gènes V pour les chaînes α et β . La diversité des boucles CDR1 et CDR2 de $V\alpha$ et $V\beta$ est limitée à celle déjà présente dans la lignée germinale. Le CDR3 est formé durant la recombinaison somatique de l'ADN. Les régions CDR3 de $V\alpha$ et $V\beta$ sont responsables d'une grande partie de la diversité du TCR $\alpha\beta$ (45). La région hypervariable CDR3 est localisée au-dessus du centre du site de liaison CMH/peptide et fait contact avec le peptide antigénique ainsi que les hélices α de la molécule du CMH. Les régions moins variables CDR1 et CDR2 vont être en contact avec les terminaisons du peptide antigénique et avec les résidus des hélices α (CDR1) ou exclusivement la partie centrale des hélices α de la molécule du CMH (CDR2).

La diversité des ligands des molécules du CMH est largement plus grande que le nombre de cellules T présent dans un individu au même moment. Il a donc été suggéré que l'habileté d'un nombre restreint de cellules T à reconnaître presque tous les complexes CMH/peptide est réalisable par une dégénérescence élevée, un phénomène aussi appelé réactivité croisée (46). La réorganisation majeure de la conformation est limitée au CDR3 (47). En effet, il a été démontré que des substitutions d'acides aminés du peptide antigénique ou des changements dans la région CDR3 peuvent changer dramatiquement l'interaction globale entre la molécule du CMH et le TCR. Ces phénomènes suggèrent que les contacts entre le CMH et le TCR sont extrêmement flexibles et qu'ils peuvent se faire de différentes façons avec la configuration finale du complexe CMH/Ag/TCR déterminée par l'antigène.

4. La voie d'apprêtement et de présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II

4.1 L'entrée des antigènes exogènes

Les antigènes peuvent entrer dans les compartiments endosomaux par divers mécanismes tels que la phagocytose, la macropinocytose, l'autophagie et l'endocytose médiée par un récepteur (48, 49). La contribution relative de chaque voie diffère beaucoup entre les différentes cellules présentatrices d'antigène. L'endocytose médiée par un récepteur est la plus spécifique des voies et peut être réalisée par différents récepteurs comme le récepteur de la cellule B (BCR), les récepteurs aux mannoses et les récepteurs Fc (50). La promiscuité dans les peptides pouvant être liés peut être un désavantage. Les peptides présentés par les molécules du CMH II sont générés dans des vésicules d'endocytose acidifiées. En effet, les protéines qui entrent dans les cellules par endocytose sont enfermées dans des endosomes. Ces endosomes s'acidifient au fur et à mesure qu'ils progressent à l'intérieur de la cellule pour fusionner finalement avec des lysosomes. Les endosomes et les lysosomes contiennent des protéases, appelées protéases acides, qui s'activent à pH acide et qui vont finalement dégrader les antigènes protéiques contenus dans les vésicules (Figure 5) (6, 20).

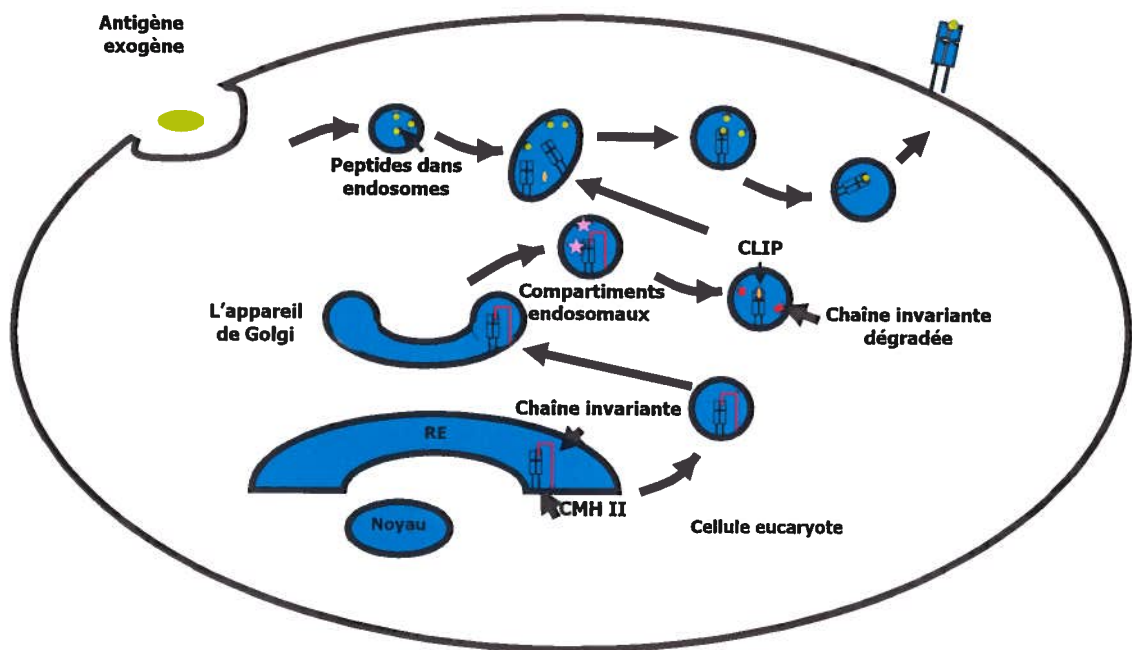


Figure 5 : Schématisation simplifiée de la biosynthèse des molécules du CMH II
(Adapté de Weeninck et Gautam, 1997)

4.2 L'assemblage des molécules du CMH de classe II

Les hétérodimères de la molécule du CMH II sont assemblés dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) (51, 52). Lors de leur assemblage, les molécules sont organisées dans leur conformation spatiale définitive. La voie de synthèse des molécules du CMH II commence par le transfert dans le RE où elles doivent être protégées d'une liaison trop précoce aux peptides transportés dans la lumière du RE ou aux polypeptides nouvellement synthétisés de la cellule. La liaison est prévenue par l'assemblage des molécules du CMH II avec une protéine chaperonne appelée chaîne invariante (Ii) (53).

4.3 La chaîne invariante (Ii) ou CD74

La chaîne invariante est une protéine membranaire intégrale de type II d'environ 31 à 43 kDa (54). Elle est codée par un gène localisé sur le chromosome 5 (bande q31-q33). La forme prédominante de la chaîne invariante chez l'humain a une longueur de 216 acides aminés avec un domaine cytoplasmique N-terminal de 30 acides aminés suivi d'une région transmembranaire de 26 acides aminés hydrophobiques (6, 28).

La chaîne invariante forme des trimères transmembranaires dont chaque unité se lie de manière non covalente à un hétérodimère $\alpha\beta$ de molécules du CMH II ce qui va donner place à un complexe nonamérique appelé $(\alpha\beta)_3Ii_3$ (55). Ii se lie à la molécule du CMH II avec une partie de son polypeptide situé à l'intérieur du sillon de liaison. Cela permet de prévenir la liaison prématurée dans le sillon d'un peptide antigénique ou d'une protéine partiellement repliée soit dans le RE ou lors de la transition vers les endosomes (6, 56). Tandis que le complexe nonamérique s'assemble dans le RE, ces composés sont associés à une protéine chaperonne, la calnexine. C'est seulement une fois les 9 chaînes réunies que le complexe se libère de la calnexine pour être transporté à l'extérieur du RE (57). En effet, la chaîne invariante possède une seconde fonction qui est de diriger les molécules du CMH II du RE à un compartiment endosomal à pH acide. Cette fonction est accomplie à l'aide d'un motif dileucine contenu dans la queue cytoplasmique de Ii (58).

4.4 Le fragment CLIP

Les complexes nonamériques sont retenus dans le compartiment endosomal afin que la chaîne invariante soit clivée en plusieurs étapes par des protéases acides. Le clivage initial de Ii génère une forme tronquée qui reste fixée à la molécule du CMH II et la retient dans le compartiment de protéolyse. Un autre clivage libère la molécule du CMH II de la chaîne Ii associée à la membrane laissant un petit fragment de 21 acides aminés, appelé CLIP, (class II associated Ii peptide) encore fixé à la molécule du CMH II (28). Deux types de protéases sont impliquées dans la dégradation de Ii, les protéases aspartiques et les protéases cystéiques (52). L'action des protéases aspartiques telles que les cathepsines D et E peut générer de petits fragments de Ii de 11 à 14 kDa et des fragments de 21 kDa. Les protéases cystéiques telles que la cathepsine B, L et S sont responsables du dernier stade de la dégradation de Ii. En effet, une étude a démontré que l'inhibition de la cathepsine S permet une accumulation du fragment p10 dans la cellule démontrant ainsi une importance de cette cathepsine dans les derniers stades de la génération du fragment CLIP (59). La structure du complexe CMH II/CLIP a été rapportée en 1995 et nous connaissons maintenant la structure des joueurs clés dans le processus d'assemblage ce qui nous permet de mieux comprendre leurs différentes fonctions (60). Suite à des études par microscopie électronique sur la localisation intracellulaire des molécules du CMH II et des chaînes invariantes, la présence d'un compartiment vésiculaire spécialisé appelé MIIC (compartiment des CMH II) a été démontrée. Il semblerait donc que le clivage final de Ii permettant de générer CLIP et le chargement d'un peptide aient lieu dans ces compartiments spéciaux MIIC (33, 61).

4.5 La molécule DM

Le détachement de CLIP est un prérequis pour permettre la liaison d'un peptide dans le sillon de la molécule du CMH II. Une molécule similaire aux CMH II est impliquée dans ce processus, HLA-DM. HLA-DM est un hétérodimère non-

polymorphique, composé d'une chaîne α de 33 à 35 kDa et d'une chaîne β de 30 à 31 kDa, exprimé par les mêmes cellules que celles exprimant les molécules classiques du CMH II. Les chaînes sont encodées dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (15). Les gènes codant pour HLA-DM sont *DMA* et *DMB* et ils ont été identifiés en 1991 comme étant des gènes de CMH non-classique. Ces gènes se situent à côté des gènes LMP/TAP et DNA dans la région du CMH II. Il y aurait une similitude d'environ 25% entre les gènes *DMA* et *DMB* et les gènes codant pour les molécules du CMH I et II. Contrairement aux molécules du CMH II, HLA-DM n'est pas exprimée à la surface cellulaire. On la retrouve toutefois dans les compartiments spéciaux MIIC (50). Le rôle de HLA-DM est de se fixer et de stabiliser les molécules du CMH II vides. Les molécules sans peptide ont tendance à s'agréger entre elles en absence de HLA-DM. Des expériences *in vitro* ont démontré que c'est dans des conditions acides (pH 5.0) que la molécule HLA-DM soluble induit la dissociation des peptides liés aux molécules du CMH II incluant le fragment CLIP. Une fois CLIP retiré, la liaison des peptides exogènes dans le sillon des molécules du CMH II est alors permise (52). HLA-DM possède un motif tyrosine dans le domaine cytoplasmique de la chaîne β qui permet le transport de la molécule jusque dans les compartiments endosomaux tardifs. Les molécules du CMH II y sont accumulées. HLA-DM semble être régulée par l'action d'une autre molécule dans ce processus de transport, HLA-DO (59).

4.6 La molécule HLA-DO

HLA-DO est en association étroite avec HLA-DM. Cette association est requise pour permettre la sortie de HLA-DO du RE. Les gènes codant pour HLA-DO sont *DO α* (*DOA*) et *DO β* (*DOB*). La molécule HLA-DO est exprimée seulement par certains sous-ensembles de cellules présentatrices d'antigène comme les cellules médullaires du thymus ou habituellement chez les cellules B non-activées (62). HLA-DO est capable d'inhiber l'action de HLA-DM dans des conditions pH-dépendantes. Cette inhibition est plus forte dans un environnement faiblement acide (63).

5. L'expression à la surface de la cellule

Après l'endocytose d'un antigène par une cellule présentatrice d'antigène, les molécules du CMH II s'accumulent en surface en quantité considérable (plusieurs millions par cellule). Elles y demeurent de façon stable et prolongée, permettant ainsi aux CPA d'activer efficacement les lymphocytes T (17). Le taux d'expression constitutif des molécules du CMH varie d'un type cellulaire à l'autre mais il y a généralement 10^5 molécules du CMH de classe II par cellule. Ce nombre est relativement similaire à l'expression des molécules du CMH de classe I qui se situe entre 10^4 à 10^5 molécules par cellule (19). L'habileté des molécules du CMH à lier un nombre élevé de différents peptides est le point central de la fonction de ces molécules. Une fois les peptides antigéniques chargés dans la cavité des molécules du CMH II, les complexes sont prêts à migrer à la surface de la cellule pour présenter leur peptide au répertoire de cellules T (64).

6. La cinétique de la présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II

Chaque étape de la biosynthèse des molécules, de la présentation d'antigène à la surface cellulaire, se fait dans un laps de temps qui lui est propre. L'assemblage des sous-unités α et β de la molécule du CMH II peut s'effectuer moins de deux minutes après leur biosynthèse. Ce dimère sera rapidement lié au trimère de chaînes invariantes et ce, dans les quinze minutes suivant leur assemblage. Le complexe nonamérique $(\alpha\beta)_3I_i3$ quitte le réticulum endoplasmique pour se diriger vers l'appareil de Golgi. Pendant son passage dans l'appareil de Golgi, les complexes sont glycosylés avant d'atteindre le système trans-Golgi. Le passage entre les deux se fait en moins de 60 minutes. Par la suite, les complexes vont atteindre la voie endocytyque en un maximum de 2 heures à l'aide de la queue cytoplasmique de I_i . En 4 heures, les complexes vont atteindre le MIIC où I_i sera progressivement dégradé. Des complexes matures CMH II/peptide vont être pour la première fois détectés dans les 30 minutes suivant leur arrivée dans le compartiment MIIC et vont apparaître à la surface de la cellule dans un autre 30 à 60 minutes. Donc,

basé sur les données de cinétique actuelles, le premier complexe CMH II/peptide peut être détecté à la surface de la cellule en moins de 6 heures après l'assemblage initial du dimère $\alpha\beta$ (6).

7. La polygénie et le polymorphisme des molécules du CMH de classe II

Chez les humains, plus de 400 molécules du CMH I et II structurellement distinctes ont été identifiées. Les sept loci HLA pouvant être exprimés sont HLA A, B, C pour les antigènes de classe I, et HLA DR (DRB1), DR 51/52/53 (DRB3/4/5), DQ (DQA1/DQB1) et DP (DPA1/DPA2) pour les antigènes de classe II. L'habileté des cellules T à discriminer entre les différents variants alléliques des molécules du CMH II indique que les sites polymorphiques sont importants dans la reconnaissance par les cellules T. En effet, les molécules du CMH II montrent une très grande variabilité génétique dans la population (65). Cette variabilité augmente la gamme des peptides dérivés des pathogènes qui peuvent être liés. Le polymorphisme correspond au fait que chaque gène est multiallélique ce qui conduit à un grand nombre de combinaisons possibles sur chaque chromosome (haplotype). Le nombre de combinaisons génotypiques dépasse 10^{10} . L'expression des allèles des molécules du CMH est co-dominante et le CMH est si polymorphique que la plupart des individus sont hétérozygotes pour chaque locus. Les différences alléliques peuvent correspondre à la mutation d'une ou de plusieurs bases. Toutefois, les différences correspondent le plus souvent à plusieurs substitutions à distance dans la séquence codante. Cette mutation correspond à un mécanisme de conversion génique par insertion ou échange d'une séquence venant d'un autre gène ou d'un pseudogène (17). Ce polymorphisme semble être responsable des variations de la réponse immunitaire de différents individus face à différents antigènes et peut contribuer à la susceptibilité à la maladie et aux désordres autoimmunitaires (32, 66).

Les histogrammes de variabilité des séquences peptidiques des molécules du CMH II montrent que les variations produites par le polymorphisme génétique sont restreintes aux domaines aminotermiaux $\alpha 1$ mais principalement $\beta 1$ des molécules (Figure 6) (17, 31, 67, 68). Le polymorphisme significatif des molécules du CMH II,

comme HLA-DR et I-E, se retrouve sur la chaîne β puisque la chaîne α est invariable. Le polymorphisme est normalement limité à de courts bouts de séquences qui sont désignées comme des régions hypervariables (69). La variabilité allélique se retrouve sur les feuillets β ou sur les hélices α au niveau de la niche peptidique (32). Les domaines à proximité de la membrane α_2 et β_2 contiennent tous les deux un lien disulfure interne et sont les plus génétiquement conservés (28, 70).

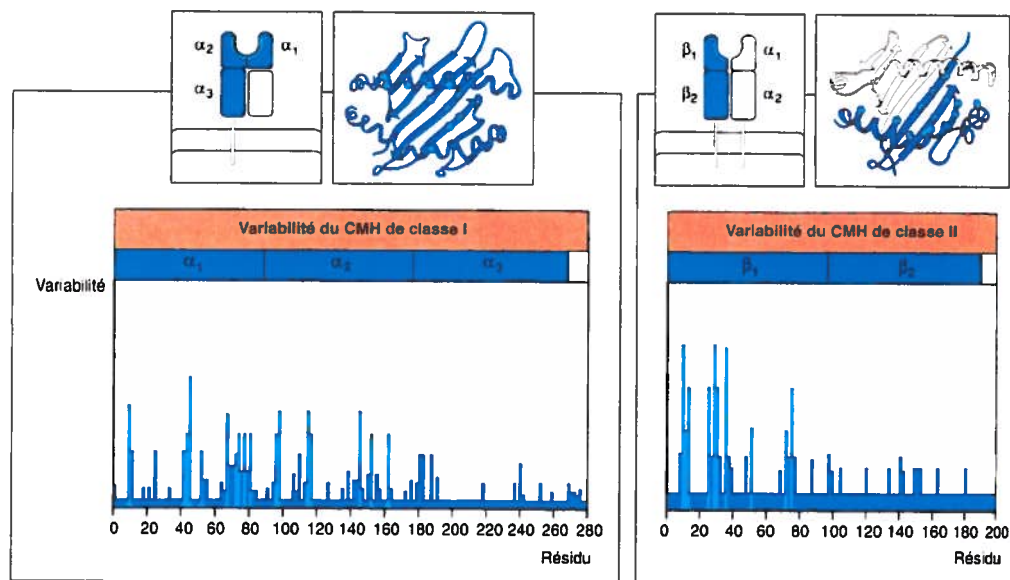


Figure 6 : Histogrammes de variabilité des séquences peptidiques d'acides aminés des molécules du CMH de classe I et classe II

8. La stabilité de la molécule du CMH de classe II

En 1992, il a été clairement démontré que la stabilité des molécules du CMH II est dépendante de la liaison du peptide (71, 72). Il est toutefois encore difficile de prédire les peptides qui sont en mesure d'être liés aux molécules du CMH II. Les molécules du CMH II sont capables de lier une grande variété de peptides mais il y a généralement des motifs de liaison caractéristiques pour chacun des allèles. Ces motifs de liaison sont contrôlés par quelques acides aminés (41). Le phénomène d'instabilité des molécules du CMH II reste encore à étudier. L'étude de Carrasco-Marin a démontré qu'une même molécule mais d'un autre haplotype peut montrer des différences au niveau de la stabilité (73). En effet, pour les molécules I-A^b, I-A^k, I-A^d et I-A^{g7}, le pourcentage de complexes CMH/peptide stables obtenus suite à une immunoprécipitation était respectivement 78, 39, 12 et 1%. Werdelin a suggéré que la fonction de base de la molécule du CMH II I-A est de protéger les peptides de la dégradation par la machinerie protéolytique des cellules présentatrices d'antigène (74). En effet, il a clairement été montré que la portion du peptide qui se lie à la molécule du CMH II est protégée contre les attaques des enzymes (75). Il est intéressant de noter la relation de bénéfice mutuel qui existe entre le peptide lié et la molécule du CMH II. Lorsque la molécule se lie au peptide, elle adopte une conformation stable qui prévient l'agrégation des molécules ainsi que la dégradation de celles-ci dans les compartiments lysosomaux (76).

Plusieurs groupes ont démontré que le pH jouait un grand rôle dans la formation de complexes stables CMH/peptide. Certains de ces groupes ont proposé que ce phénomène permettrait d'expliquer les anomalies observées entre l'efficacité de la présentation d'antigène *in vivo* et la lenteur de la formation des complexes à pH neutre *in vitro*. Les agents comme la chloroquine et le chlorure d'ammonium sont capables d'augmenter le pH des compartiments endocytiques ce qui amène donc une inhibition de la présentation d'antigène. Pour obtenir un ratio optimal de formation de complexes CMH II/peptide, le pH doit se tenir entre pH 4.5 et 5.0. Toutefois, les différents haplotypes peuvent nécessiter des pH différents pour optimiser la liaison du peptide avec la molécule du CMH II. Par exemple, la molécule I-E nécessite un pH de 4.5 alors que la molécule I-

A requiert un pH entre 5.5 et 6.5. Les bases moléculaires pour les effets observés du pH sur la capacité de liaison du peptide antigénique aux molécules du CMH II semblent être expliquées par deux mécanismes. Le premier implique un changement spécifique dans la cinétique des interactions CMH/peptide par un changement de conformation de la molécule. Ce changement rendrait ainsi la molécule du CMH II plus compétente à former des complexes fonctionnels avec les peptides. En lien avec le premier mécanisme, le second implique des changements dans le niveau de récepteur non-occupé disponible pour la liaison peptidique (77-79).

9. La purification et la caractérisation des molécules du CMH de classe II et leurs peptides

En 1985, Babbitt et son équipe furent les premiers à démontrer qu'il était possible de stimuler une cellule T par un peptide lorsque celui-ci est présenté par une molécule du CMH II (80). L'intérêt grandissant des scientifiques pour les molécules du CMH a nécessité le développement de techniques permettant d'isoler et de caractériser les peptides associés aux molécules du CMH. Deux techniques sont maintenant couramment utilisées, l'approche protéomique et l'approche de biologie moléculaire.

L'approche protéomique nécessite la purification des complexes CMH/peptide par chromatographie d'affinité. Cette étape n'est pas toujours une chose facile. En effet, le faible nombre de complexes CMH/peptide exprimés à la surface de la cellule et l'instabilité de ces complexes amènent parfois quelques difficultés. Il y a différents facteurs qui peuvent influencer la stabilité des complexes comme une faible liaison entre les chaînes α et β des hétérodimères ou la présence d'une faible liaison entre le peptide et la molécule du CMH. La stabilité des molécules du CMH de classe II est fondamentale dans la réponse des cellules T (77). Dans les dernières années, il a été démontré que certaines conditions étaient nécessaires pour arriver à isoler ces protéines sous une forme native et fonctionnelle. Plusieurs équipes ont eu recours à des méthodes de purification des molécules de CMH par chromatographie d'affinité en utilisant des anticorps monoclonaux immobilisés à une résine (81-86). Toutefois, chacune de ces méthodes est

propre à elle-même puisque les paramètres tels que les détergents, les tampons d'élution, le pH et les concentrations utilisées diffèrent pour chacune des méthodes. Cette approche nous permet de purifier les molécules du CMH désirées sur les cellules et, par la suite, d'isoler et de caractériser le répertoire complet des peptides associés aux complexes purifiés. La caractérisation se fait à l'aide d'un spectromètre de masse qui est un appareil très sensible nous permettant d'analyser précisément la masse des différentes molécules dont les polypeptides, de sélectionner et fragmenter les peptides d'intérêt pour en déterminer la séquence en acide aminés. Toutefois, dépendamment du niveau d'expression des complexes étudiés, un nombre important de cellules est parfois requis. Étant donné la complexité du répertoire peptidique, cela amène une lourde tâche de caractérisation des peptides isolés. Finalement, la purification des peptides nécessite l'utilisation de divers détergents qui peuvent nuire à l'analyse par spectrométrie de masse.

Cette technique peut également être utilisée pour purifier et caractériser les molécules du CMH I et leurs peptides. Étant donné les nombreuses différences entre les molécules du CMH I et CMH II comme la structure, il n'est pas étonnant de constater que les conditions de purification diffèrent. La majorité des purifications réalisées pour les molécules du CMH I ont eu recours aux détergents Nonidet P-40 ou au 3-[(3-cholomidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propane sulfate (CHAPS) (82, 87-89). Pour la purification de complexes CMH II/peptide, certains groupes ont utilisés du Nonidet P-40 (58, 90, 91) alors que d'autres ont utilisé les détergents β -octyl-glucoside (β -OG), n-octyl β -D-glucoside ou MEGA-8 et MEGA-9 (30, 85, 86, 92).

10. Pourquoi identifier des épitopes présentés par les molécules du CMH I et II ?

Il est pourtant reconnu que les molécules du CMH de classe II sont cliniquement aussi importantes que les molécules du CMH de classe I dans les maladies autoimmunes comme, par exemple, dans les diabètes autoimmuns (73) et le mimétisme moléculaire dans l'encéphalite autoimmune expérimentale communément appelée EAE (93, 94). Les molécules du CMH II sont également les principales responsables des rejets aigus ou

chronique de greffe d'organe. L'étude des molécules du CMH II et leur ligand est d'intérêt général parce qu'ils sont potentiellement utiles pour la conception de vaccins et pour la compréhension des maladies autoimmunes (95). Une étude a montré que des constructions de peptides peuvent offrir l'opportunité d'augmenter considérablement la réponse des cellules Th1 et Th2 aux épitopes des molécules du CMH II à des fins thérapeutiques (29). En ce qui a trait aux cancers, les thérapies chirurgicales et par radiation sont toujours des traitements principalement utilisés. Dans certains cas, ces thérapies peuvent également permettre la guérison d'un certain pourcentage de patients. Toutefois, au cours des dernières années, des approches alternatives basées sur la thérapie génique et l'immunothérapie ont attiré l'attention des scientifiques (96). Les peptides présentés par les molécules du CMH au système immunitaire ont été démontrés comme étant des candidats intéressants pour le développement de thérapies et/ou des approches prophylactiques pour le traitement du cancer. L'identification et la caractérisation de ces peptides sont également à la base de production de vaccins thérapeutiques ou de stimulation de cellules T CD8+ plus efficaces pour des thérapies adoptives (97).

Les molécules du CMH I et II associées à des peptides du soi sont impliquées dans la sélection positive et négative des thymocytes. Certains de ces peptides, appelés antigènes mineurs d'histocompatibilité (MiHAs), sont polymorphiques et peuvent déclencher efficacement la réponse des cellules T entre les molécules du CMH d'individus identiques. L'immunodominance est le dispositif le plus important de la réponse aux MiHAs des cellules T. La maladie "Graft-Versus-Host" (GVHD) est probablement la plus importante réaction immunopathologique déclenchée par les MiHAs en médecine clinique (98-101). L'identification et la caractérisation de ces MiHAs sont essentielles pour nous en apprendre plus sur les mécanismes de ces maladies. Par exemple, un nonapeptide AAPDNRETF restreint aux molécules du CMH I (H-2D^b) a été isolé à partir de cellules de souris C57BL/6 par Perreault et ses collaborateurs. Ce peptide possède les caractéristiques moléculaires des MiHAs dominants et il a été démontré que les lymphocytes T activés par ce peptide causent la GVHD chez les souris (102). Cette même équipe a également démontré qu'il était possible d'induire une réponse curative anti-leucémique sans causer par la même

occasion la GVHD. Pour démontrer ce fait, des lymphocytes T activés par une molécule du CMH I (H-2D^b) restreinte à un antigène immunodominant mineur (B6^{dom1}) ont été injectés dans des hôtes B10 (103). Des études similaires sont également effectuées chez l'homme. Par exemple, les MiHAs HA-1 et HPA-5 ont été démontrés comme étant responsables de la GVHD au niveau des transplantations de moelle osseuse (104, 105). Il a également été démontré que le CD31 était un MiHAs et que certaines mutations pouvaient augmenter drastiquement la prédisposition à la GVHD (106).

Avec les années, de plus en plus de peptides impliqués dans différents désordres immunitaires ont été identifiés. La spectrométrie de masse a grandement contribué à leur identification. D'ailleurs cette technique a permis d'identifier plusieurs peptides contenant des modifications posttranscriptionnelles telles que la désamination des asparagines, la cysténylation des cystéines et la glycosylation. Il a été démontré que ces modifications posttranscriptionnelles altèrent l'habileté des lymphocytes T à reconnaître les épitopes restreints aux molécules du CMH I et II (88). En 1996, un peptide naturel correspondant à un épitope de la tyrosinase a été identifié. Ce peptide est le résultat d'une conversion posttranscriptionnelle d'une asparagine par un acide aspartique. Ce changement a montré une importance au niveau de la reconnaissance du peptide par les cellules T de mélanomes spécifiques. Toutefois, la modification n'a créé aucun impact au niveau de la liaison avec la molécule du CMH. Cette étude a été la première à démontrer une modification posttranscriptionnelle d'un peptide naturel associé à une molécule du CMH (107). Une autre modification posttranscriptionnelle telle que la phosphorylation des peptides provenant des cellules cancéreuses versus les cellules normales donne une nouvelle série d'antigènes spécifiques de tumeur utilisables pour de nouvelles immunothérapies (88). L'approche de biologie moléculaire, c'est-à-dire par le criblage d'une banque d'ADN complémentaire soient de vecteurs eucaryotes ou procaryotes, de bactéries ou de phages, ne permet pas de prédire ces modifications posttranscriptionnelles. En effet, cette technique bien que plus simple à mettre au point comporte plusieurs désavantages comme l'impossibilité d'analyser un répertoire peptidique mais seulement quelques peptides spécifiques (108).

11. L'alloréactivité

Il a été montré qu'environ 1 à 10% de toutes les cellules T d'un individu répondent à la stimulation par les lymphocytes d'un autre membre de la même espèce sans lien de parenté. En effet, comparativement aux antigènes étrangers qui sont reconnus par environ une cellule T sur 100 000, les alloantigènes sont reconnus par environ une cellule T sur 100. La fréquence élevée de cellules T capables de répondre aux alloantigènes présentés par les molécules du CMH est à la base de la rapidité des rejets de transplantations allogéniques (109, 110). Cette réponse des cellules T est appelée alloréactivité parce qu'elle représente la reconnaissance du polymorphisme allélique des molécules du CMH.

La reconnaissance peut se faire via deux voies, la voie directe ou la voie indirecte. L'alloréponse directe et indirecte sont médiées par des cellules présentatrices d'antigène différentes et diffèrent également dans leurs mécanismes cellulaires. La voie directe implique la reconnaissance d'une molécule du CMH présentant un peptide sur une molécule du donneur qui est reconnu par les cellules T du receveur. La voie indirecte d'alloréactivité requiert la présentation d'un peptide dérivé de la greffe par une molécule du CMH présente à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène dans un contexte de restriction au soi (111-113). La voie indirecte est la voie normale de présentation d'antigène du système immunitaire et son importance clinique dans le rejet de greffe a été démontrée au début des années 1980 (114, 115).

Le mode d'interaction entre les cellules T alloréactives et les molécules du CMH Il demeure encore bien méconnu puisque les cellules T interagissent avec des molécules du CMH allogéniques pour lesquelles les cellules n'ont pas été éduquées (113). En effet, les thymocytes subissent une sélection positive et négative lors de leur maturation ce qui permet la formation d'un répertoire de cellules T périphériques capables d'interagir avec les molécules du CMH du soi (116, 117). Identifier et caractériser les ligands des cellules T allogéniques est la clé de la compréhension de l'alloréactivité (108). Deux principales hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène au niveau de la reconnaissance

du complexe CMH/peptide par le TCR. Dans la première, le peptide jouerait un rôle majeur dans la reconnaissance. Une seule molécule du CMH allogénique pouvant présenter une vaste gamme de peptide du soi, ceci permettrait à différents clones de cellules T d'être activés, chacun ayant une spécificité différente pour les complexes CMH/peptide. Les interactions se feraient principalement entre le TCR et le peptide. Dans la deuxième hypothèse, le TCR alloréactif interagirait principalement avec la molécule du CMH. Bref, l'interaction entre le TCR et le CMH serait si forte qu'elle se ferait indépendamment du peptide qui est présenté. Aujourd'hui, il est démontré que le peptide et la molécule du CMH sont tous les deux importants dans la reconnaissance. L'alloréactivité est donc un phénomène hétérogène puisque certains TCR vont reconnaître un peu plus soit le peptide ou la molécule du CMH (118-120).

12. Les modèles d'études

Les peptides du soi liés aux molécules du CMH jouent un rôle important dans l'alloréactivité (2-4). Les progrès réalisés sur l'identification et la caractérisation de ces peptides ont jusqu'ici été principalement réalisés sur des systèmes impliquant des molécules du CMH I (1). Il y a très peu d'informations disponibles sur l'alloréactivité des molécules du CMH de classe II et l'implication des peptides qui sont présentés.

La plupart des recherches qui ont été effectuées sur les molécules du CMH de classe II se sont concentrées sur la molécule du CMH de classe II I-A particulièrement sur I-A^k et I-A^{g7} (31, 66, 83, 85, 121, 122). En ce qui a trait aux molécules du CMH de classe II I-E, il y a quelques études sur I-E^k (123, 124), I-E^d (125-127), I-E^u (128), mais pratiquement aucune sur I-E^p (5, 120). Nous observons également le même manque au niveau des études réalisées sur les HLA-DR, DP et DQ (32). Malgré les progrès réalisés au cours des dernières années sur la nature du peptide, le principe de reconnaissance d'un alloligand par le TCR reste encore à étudier que ce soit humain ou murin (120).

12.1 Le modèle de la cellule T 2.102

Le laboratoire de Claude Daniel s'intéresse à l'étude des mécanismes de rejet de greffe par les voies d'alloréactivité directe et indirecte aux antigènes de classe II. Un modèle d'étude murin impliquant le clone de cellule T CD4⁺ dérivé du clone Th2 2.102 communément appelé cellule T 2.102 a été mis au point pour mieux comprendre les mécanismes d'alloréactivité (5). Le modèle va permettre de comparer comment un TCR interagit avec un ligand nominal (restriction au soi, voie indirecte) ainsi qu'avec un ligand allogénique (voie directe) (Figure 7). Ce clone est spécifique au peptide immunodominant Hb(64-76) lorsque présenté par une molécule du CMH II I-E^k (ligand nominal) (5, 129). Ce peptide immunodominant correspond aux acides aminés 64 à 76 de l'allèle *d* mineur de la chaîne β de l'hémoglobine de souris (130). Le clone T 2.102 a été généré suite à l'immunisation de souris d'haplotype H-2^k avec l'hémoglobine de souris. Le complexe CMH II I-E^k/peptide Hb(64-76) est idéal pour l'étude de l'alloréactivité des molécules du CMH II puisqu'il est maintenant bien caractérisé biologiquement et biochimiquement (129-131). De plus, la structure cristallographique du complexe est maintenant connue. C'est un élément important pour la compréhension du fonctionnement des molécules (41). La cellule T 2.102 est également alloréactive contre les molécules du CMH II I-E^p pouvant provenir des splénocytes de souris d'haplotype H-2^p ou la lignée cellulaire CH27-E^p (ligand allogénique). Les peptides naturels présentés par les molécules du CMH II I-E^p stimulant l'alloréactivité de la cellule T 2.102 ne sont pas encore connus.

L'objectif de ce projet est donc d'identifier et de caractériser ces peptides naturels à l'aide d'une purification des molécules du CMH II par chromatographie d'affinité et la caractérisation des peptides associés aux molécules. L'identification et la caractérisation de ces peptides augmenteraient nos connaissances et ce, sur différents points. Tout d'abord, étant donné que le modèle T 2.102 est un modèle d'étude impliquant des souris transgéniques, il serait intéressant de connaître les allopeptides responsables du rejet de greffe dans notre étude et être en mesure de déterminer l'affinité du TCR avec son ligand *in vivo*. Finalement, il serait intéressant d'en apprendre plus au niveau moléculaire afin de

tenter d'identifier des motifs importants dans la reconnaissance des alloligands par le TCR.

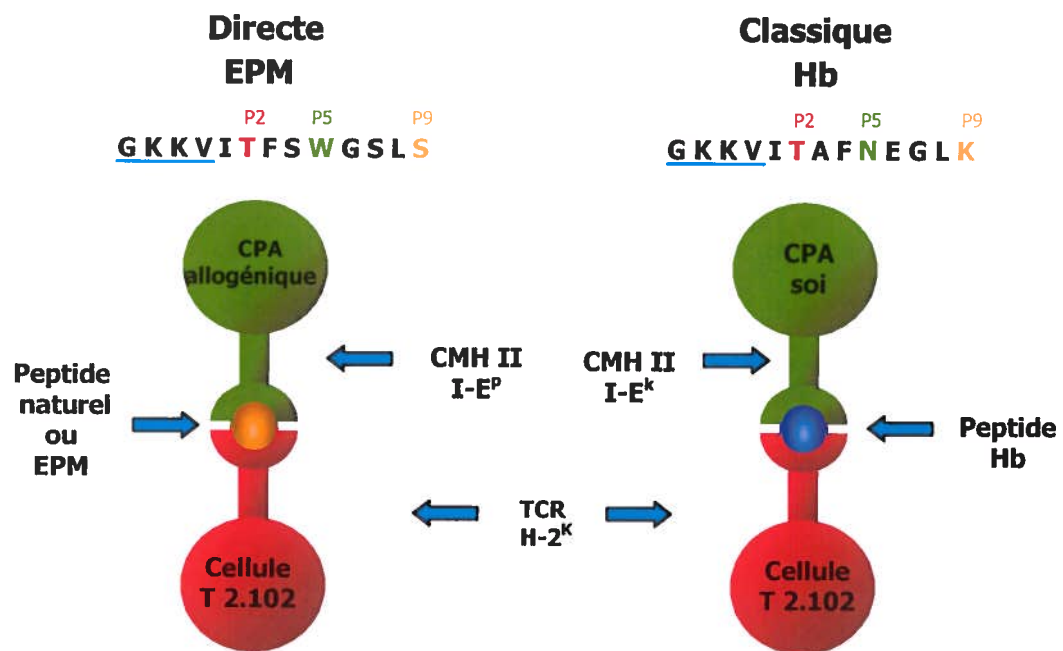


Figure 7 : Modèle d'alloréactivité T 2.102
(Adapté de Daniel *et al.*, Immunity. 1998)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Cellules

1.1 Lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires d'origine murine ont été utilisées tout au long de cette étude. Premièrement, l'hybridome 14.4.4s (132) a été utilisé pour sa capacité à produire des anticorps spécifiques (IgG_{2a}) contre la chaîne α des molécules du CMH II I-E^k et I-E^p. L'hybridome 17-3-3s (132) a également été utilisé pour sa capacité à reconnaître la chaîne β des molécules du CMH II I-E^k autant sous la forme native de la molécule que lorsque la chaîne est libre. L'anticorps 14-4-4s reconnaît seulement la forme native de la molécule. Ces deux anticorps spécifiques ont été utilisés pour la purification des molécules du CMH de classe II, pour la révélation de ceux-ci par immunoempreinte de type "Western" et pour la détection par cytométrie en flux.

Deuxièmement, nous avons utilisé différentes lignées cellulaires de souris qui expriment de façon constitutive des molécules du CMH II. Tout d'abord, les lymphomes B CH27 expriment constitutivement et naturellement les molécules du CMH de classe II I-E^k (133). Les cellules CH27mHEL/Hb(64-76) expriment constitutivement I-E^k ainsi que les acides aminés 64 à 76 du peptide de l'hémoglobine inséré dans une forme transmembranaire de la molécule du lysozyme de blanc d'oeuf de poule (HEL)(30). La lignée cellulaire CH27-E^p exprime de façon constitutive les molécules du CMH II I-E^k ainsi que les molécules du CMH II I-E^p suite à une transfection avec une construction qui permet l'expression constitutive de la chaîne β de I-E^p (134). La lignée cellulaire CH27-E^p-EPM (données non publiées) est la lignée CH27-E^p qui a été transfectée avec une construction qui permet l'expression constitutive de l'allomimotope EPM (120). Les fibroblastes CHO-E^k et CHO-E^p sont des cellules d'ovaires de Hamster Chinois qui expriment respectivement de façon constitutive les molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^p. Les cellules COS-7, cellules de rein de singe, sont des cellules adhérentes facilement transfectables de façon transitoire. Les hybridomes T 2.102 expriment le TCR 2.102, spécifique au modèle de souris du laboratoire (120, 129). Finalement, la lignée cellulaire CTLL-2, cellules dépendantes de l'interleukine 2 (IL-2) pour leur croissance, a été utilisée pour l'analyse de l'activation des hybridomes T 2.102.

Lignées cellulaires	Complexes du CMH II I-E
CH27	I-E ^k
CH27mHEL/Hb(64-76)	I-E ^k et I-E ^k /Hb(64-76)
CH27-E ^p	I-E ^k et I-E ^p
CH27-E ^p -EPM	I-E ^k , I-E ^p , I-E ^p /EPM

* Les molécules représentées ici sont des complexes CMH II I-E soit avec un peptide naturel si non mentionnée ou avec un peptide spécifique à la molécule.

Tableau 1: Les molécules du CMH II I-E exprimées sur les différentes lignées cellulaires

1.2 Cultures cellulaires

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à 37°C dans un incubateur humidifié et sous une atmosphère de 5% de CO₂. Les hybridomes 14-4-4s et 17-3-3s ont été cultivés dans du milieu RPMI-1640 (Gibco Invitrogen Corporation, Burlington, ON) additionné de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (FCS) (Hyclone, Logan, UT), 2 mM de glutamax (Gibco Invitrogen Co.), 50 µg/ml de gentamicine (Gibco Invitrogen Co.) et de 2x10⁻⁵ M de 2-β-mercaptonéthanol (2-ME) (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio). Les cellules CH27 et les hybridomes T 2.102 ont été cultivés dans les mêmes conditions mais avec du sérum bovin de veau (Hyclone) au lieu du sérum de veau foetal. Les cellules CH27-E^p ont été cultivées dans le même milieu que les CH27 mais avec un antibiotique de sélection, la généticine (Gibco Invitrogen Co.). La généticine a été ajoutée à 0,5 µg/ml. Les cellules CH27-E^p-EPM ont été cultivées dans le même milieu avec antibiotique que les CH27-E^p mais également en présence de 0,2 µg/ml de zéocine (Gibco Invitrogen Co.). Les cellules CH27mHEL/Hb(64-76) ont été cultivées dans le même milieu mais en présence d'un antibiotique de sélection différent, la puromycine (Sigma, St-Louis, MO) à 1 µg/ml. Les cellules CHO-E^k et CHO-E^p ont été cultivées dans du milieu Minimal essentiel medium alpha (MEMα) (Gibco Invitrogen Co.) supplémenté

de 5% (v/v) de FCS, 2 mM de glutamax, 50 µg/ml de gentamicine et 0,5 µg/ml de Généticine comme antibiotique de sélection. Les cellules COS-7 ont été cultivées dans du Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco Invitrogen Co.) supplémenté de 5% (v/v) de FCS, 2 mM de glutamax et 50 µg/ml de gentamicine. Finalement, les CTLL-2 ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Gibco Invitrogen Co.) supplémenté de 10% (v/v) CBS, 2 mM de glutamax, 50 µg/ml de gentamicine avec de l'IL-2 pour permettre leur croissance.

2. Production et purification d'anticorps monoclonaux

2.1 Production de surnageant

Les hybridomes 14-4-4s et 17-3-3s ont été cultivés dans des flacons agitateurs contenant 1 litre de milieu de culture approprié (voir section 1.2) avec 10 mM d'HEPES (Gibco Invitrogen Co.). La culture cellulaire a été enrichie avec 1% (p/v) de glucose (ICN Biochemicals Co.) et 15 mM d'HEPES (Gibco Invitrogen Co.) pour obtenir une concentration finale de 25 mM. Les cellules ont été cultivées jusqu'à ce que la viabilité chute à 20%. La culture cellulaire a ensuite été centrifugée à 10 000 x g dans un Rotor Beckman JA-10 pendant 30 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Beckman J2-21M. Les surnageants contenant les anticorps ont été récupérés et conservés à 4°C avec 0,05% de NaN₃ (Sigma) pour empêcher la contamination bactérienne.

2.2 Purification des anticorps

Les anticorps ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur une résine de sépharose 4B Fast Flow couplée à la protéine G (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Toutes les étapes de purification des anticorps ont été effectuées à 4°C. Un volume de 5 ml de gel a été déposé dans une colonne de 1,5 cm de diamètre et a été conditionné avec 10 volumes de tampon PBS 1X (Phosphate-buffered saline) pH 7,4. Le surnageant de culture d'hybridomes a été passé à un débit de 1 ml/min sur la colonne

pour permettre aux anticorps de s'adsorber à la protéine G. La résine a ensuite été lavée avec du tampon PBS 1X jusqu'à ce que la densité optique (D.O.) à 280 nm notée par spectrophotométrie soit minimale. Des fractions de 1 ml ont été récoltées lors d'une élution dans un tampon 0,1 M glycine-HCl pH 2,7 à un débit de 1 ml/min. Chacune de ces fractions a été neutralisée par l'ajout de 100 µl de tampon 1,0 M Tris-HCl pH 9,0. La colonne a été ensuite régénérée par le passage de tampon glycine-HCl pH 2,0 jusqu'à ce que la D.O. soit minimale signifiant ainsi l'élimination de toutes protéines sur la colonne. Finalement, la colonne a été reconditionnée par le passage de tampon PBS 1X pH 7,4 jusqu'à ce que le pH de la colonne passe de 2,0 à la neutralité.

2.3 Dosage des anticorps purifiés

La densité optique à 280 nm de chacune des fractions a été prise et toutes les fractions ayant une valeur supérieure à 0,2 ont été regroupées. La concentration d'anticorps en mg/ml a été estimée en considérant un coefficient d'extinction molaire de 1.4 à une longueur d'onde de 280 nm. Les anticorps purifiés ont ensuite été dialysés et conservés à 4°C avec 0,05% de NaN₃ dans du tampon PBS 1X.

2.4 Électrophorèse de protéines (SDS-PAGE)

La pureté des anticorps purifiés a été vérifiée à l'aide d'une électrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide. Les gels de polyacrylamide ont été préparés à l'aide de l'appareil du système "Mini-Protean II" de Bio-Rad (Laemmli, 1970) et selon le protocole abrégé qui suit. Le gel de séparation (12% (p/v) acrylamide/Bis, 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, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (p/v) SDS, 0,05% (p/v) persulfate d'ammonium, 0,01% 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 présence ou en absence de conditions réductrices (i.e. 2-ME) et incubés à 100°C pendant 5 minutes

pour dénaturer les protéines. Les échantillons ont été chargés sur le gel d'acrylamide ainsi qu'un standard coloré de faibles masses moléculaires (Bio-Rad). La migration a été effectuée à 200 volts pendant 45 minutes dans un tampon de migration contenant 24,8 mM de Tris pH 8,3, 192 mM de glycine et 0,1% (p/v) de SDS.

2.5 Coloration des protéines

Les gels ont été colorés pendant une heure dans une solution contenant 0,1% de bleu de Coomassie G-250, 40% (v/v) méthanol et 10% acide acétique glacial. Ils ont ensuite été décolorés avec une solution de décoloration (50% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique.

3. Production et purification de complexes CMH de classe II murin I-E^k et I-E^p

3.1 Préparation de l'immunoabsorbant

Les anticorps 14-4-4s purifiés ont été utilisés pour la chromatographie d'affinité. Les anticorps ont préalablement été dialysés dans un tampon de couplage (0,1 M NaHCO₃ pH 8,5, 0,5 M NaCl) à 4°C. Pour faire la colonne, 45 mg d'anticorps 14-4-4s purifiés ont été couplés à 3 g de gel sépharose 4B Fast Flow activé au bromure de cyanogène (CNBr) (Amersham Pharmacia Biotech). Le gel a d'abord été gonflé dans une solution de 1 mM HCl, et ensuite, combiné aux anticorps. Les anticorps ont été couplés au gel par inversion à 4°C pendant 16 heures ou jusqu'à ce que la D.O. à 280 nm soit minimale. Par la suite, les groupements réactifs résiduels ont été bloqués par une seconde incubation de 16h 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, 0,5 M NaCl). Le gel a été conservé à 4°C avec 0,05% NaN₃.

3.2 Solubilisation de l'antigène

Les cellules CH27-E^P-EPM ont été cultivées jusqu'à l'obtention de 2×10^{10} cellules dans un volume total de 10 litres. Les cellules ont été centrifugées à 5 000 rpm dans un rotor Beckman JA-10 dans une centrifugeuse Beckman J2-21M pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules ont été lavées à deux reprises par centrifugation à 600 x g dans du tampon PBS 1X pH 7,4. Les cellules ont ensuite été solubilisées dans un tampon PBS 1X contenant 10 mM d'iodoacétamine (Sigma), 1 mM de PMSF (Sigma), 20 µg/ml de leupeptine (Sigma) et 40 mM des détergents MEGA-8 et MEGA-9 (Sigma). La solubilisation s'est faite à une concentration de 5×10^8 cellules par ml pendant une heure à 4°C par inversion. Le lysat cellulaire a été centrifugé à 8 000 rpm dans un rotor Beckman JA-10 pendant 40 minutes à 4°C permettant d'éliminer les composantes insolubles telles que des agrégats et des noyaux et de conserver les composantes membranaires (71). Le surnageant contenant les antigènes a été conservé à 4°C jusqu'à son utilisation.

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

Les composantes membranaires solubilisées comprenant les complexes I-E^k/peptide et I-E^P/peptide correspondant aux épitopes conformationnels pouvant être reconnus par les anticorps 14-4-4s ont été adsorbées sur la résine de sépharose 4B Fast Flow-CNBr. Toutes les étapes de purification des complexes ont été effectuées à 4°C. La résine a été préalablement couplée aux anticorps pendant 16 heures par rotation inversée. Le gel a alors été déposé dans une colonne à chromatographie de 1,5 cm de diamètre. La colonne a été lavée avec du tampon de lavage (PBS 1X pH 7,4, 10 mM MEGA-8 et 10 mM MEGA-9) jusqu'à ce que la D.O. soit minimale. Les complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^P/peptide ont été élués dans un tampon d'élution (0,1 M Tris pH 10,6, 0,15 M NaCl, 20 mM de MEGA-8 et MEGA-9) en récoltant des fractions de 1 ml à un débit de 0,2 ml/min. Chacune de ces fractions a été neutralisée par l'ajout de 100 µl de tampon 1,0 M Tris-HCl pH 6,8. La colonne a été ensuite régénérée par le passage du même tampon mais sans les détergents MEGA-8 et MEGA-9 jusqu'à ce que la D.O. à 280 nm soit

minimale. Finalement, la colonne a été reconditionnée par le passage de tampon PBS 1X pH 7,4 jusqu'à ce que le pH soit neutre.

3.4 Dosage des complexes I-E^k et I-E^p purifiés

La densité optique à 280 nm de chacune des fractions a été mesurée et toutes les fractions ayant une valeur supérieure à 0,2 ont été regroupées. La concentration de complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^p/peptide en mg/ml a été estimée en considérant un coefficient d'extinction moléculaire de 1.5 à une longueur d'onde de 280 nm. Les complexes purifiés ont ensuite été conservés à 4°C avec 0,05% de NaN₃.

4. Séparation des peptides obtenus à partir des complexes I-E^k et I-E^p purifiés

4.1 Récupération des peptides associés aux molécules du CMH II I-E^k et I-E^p

Les peptides associés aux molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^p ont été récupérés par traitement acide. Tout d'abord, les complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^p/peptide ont été concentrés à l'aide d'une membrane Amicon YM30 et de l'appareil de concentration (Amicon, Beverly, MA) à une pression de 64 psi et à 4°C. L'échantillon concentré a été distribué en 200 µl par tube en verre de 5 ml et 1,5 ml d'acétonitrile froid a été ajouté à chaque tube pour permettre la précipitation des complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^p/peptide. Les tubes ont été doucement agités et mis sur la glace pendant 30 minutes pour être ensuite centrifugés à 3 700 x g dans un rotor Beckman JA-17. Par la suite, l'acétonitrile a été retirée et chacun des culots a été resuspendu dans 100 µl de 2,5 M d'acide trifluoroacétique (TFA) afin de dissocier les peptides des molécules du CMH de classe II par la dénaturation de celles-ci. Les tubes ont été agités à l'aide d'un vortex et incubés pendant 30 minutes à 37°C. Finalement, tous les tubes contenant les peptides ont été combinés dans un microconcentrateur Centricon-10 (Amicon) et centrifugés à 6 400 rpm dans un rotor Beckman JA-17 à 4°C afin d'éliminer les chaînes libres des molécules du CMH II I-E^k et I-E^p (30).

4.2 Séparation des peptides purifiés par HPLC

La séparation des peptides a été faite par la méthode «High-performance-liquid-chromatography» communément appelée HPLC. L'échantillon a été analysé sur une colonne Vydac 218TP54 C₁₈ (particule 5 µm; 4,6 mm x 25 cm; diamètre des pores 300-Åmstrong) (Vydac, Hesperia, CA) selon le gradient suivant à un débit de 0,5 ml/min; 0-60 min: 98% A/2% B à 62% A/38% B; 60-85 min: 62% A/38% B à 25% A/75%B; 85-100 min: 25% A/75% B à 2% A/98% B; 100-105 min: 2% A/98% B à 98% A/2% B. Le solvant A était composé de 0,06% de TFA dans de l'eau et le solvant B était composé de 0,052% TFA dans 80% d'acétonitrile. De plus, l'absorbance a été notée à des longueurs d'onde de 214 et 280 nm par un détecteur Waters (71). Avant le passage de l'échantillon, plusieurs mises au point ont dû être effectuées telles que le passage du gradient sans peptide, du peptide synthétique EPM dans les conditions initiales du gradient ($5,2 \times 10^{-3}$ M TFA) et dans les conditions de l'échantillon (2,5 M TFA). Le peptide EPM a été déposé dans deux conditions différentes afin de vérifier si la concentration de TFA dans l'échantillon avait une influence sur la séparation des peptides par HPLC. Les fractions contenant les peptides séparés selon leur hydrophobicité ont été récoltées toutes les 0.5 min (71).

5. Analyse de la stabilité des complexes CMH de classe II

5.1 Immunoprécipitation

La stabilité des complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^p/peptide purifiés ou obtenus suite à la solubilisation des cellules a été testée par une immunoprécipitation suivie d'une immunoempreinte de type "Western". L'immunoprécipitation consiste à adsorber les complexes CMH II/peptide sur des billes de sépharose couplées aux anticorps utilisées lors de la purification des complexes pour permettre de concentrer les antigènes. Le mélange d'environ 50 µl de résine de sépharose 4B Fast Flow activée au CNBr couplée aux anticorps 14-4-4s et 450 µl de lysat cellulaire contenant des

complexes CMH II/peptide a été agité par inversion pendant 16 heures à 4°C. Les billes ont été préalablement préparées tel que décrit à la section 3.1 et les complexes CMH II/peptide provenant de la solubilisation des cellules tel que décrit à la section 3.2. Les billes de sépharose ont ensuite été centrifugées afin de vidanger le surnageant et ont été lavées deux fois avec un tampon PBS 1X pH 7,4.

5.2 Immunoempreinte de type « Western »

5.2.1 Préparation de l'échantillon

Suite à l'étape d'immunoprécipitation, chaque échantillon a été séparé également en trois tubes. Chacun des trois tubes a été mis en présence de 10 µl de tampons différents. Le premier tube a été mis en présence de PBS 1X pH 7,4 servant de témoin pour l'expérience. Les deux autres tubes ont été mis en présence de deux tampons d'élution soit le 0,1 M diéthylamine pH 10,65 et Tris 0,1 M pH 10,6. Les deux contenaient 0,15 M NaCl, 20 mM MEGA-8 et 20 mM MEGA-9. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 30 minutes à température de la pièce afin de déterminer la présence et la stabilité des CMH II/peptide. Chaque échantillon a été dilué 1/2 avec du tampon d'échantillon et analysé par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide tel que décrit à la section 2.4.

5.2.2 Transfert des protéines sur la membrane

Après la migration sur gel de polyacrylamide, les protéines du gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech) dans un appareil « mini trans-BLOT cell » (Bio-Rad) à 100 volts pendant une heure dans un tampon de transfert (48 mM de Tris, 39 mM de glycine, 0,037% (v/v) de SDS, 20% (v/v) méthanol). Suite au transfert, la membrane de nitrocellulose a été

légèrement agitée pendant une heure à température pièce dans une solution de blocage composée de 5% de lait écrémé dans du PBS 1X pH 7,4.

5.2.3 Révélation

La membrane a été déposée dans 10 ml de tampon de blocage contenant 2 µg/ml d'anticorps 14-4-4s ou 17-3-3 biotinilés pendant une heure à température pièce avec une légère agitation. Un lavage de 15 minutes et un lavage de 5 minutes dans du PBS 1X pH 7,4 ont été effectués et la membrane de nitrocellulose a été déposée à nouveau dans un tampon de blocage avec 12,5 µg de streptavidine couplée à la peroxydase (SA-HRP). Deux lavages ont été effectués. La membrane de nitrocellulose a ensuite été mise pendant une minute en présence d'un mélange de deux réactifs fournis avec la trousse de détection en chimiluminescence ECL (Amersham Pharmacia Biotech). La réaction de chimiluminescence a été révélée suite à l'exposition d'un film (X) Kodak.

6. Analyse de l'activation de l'hybridome T 2.102 par les complexes CMH de classe II

6.1 Test d'activation des hybridomes T

L'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 a été mesurée par un test d'activation des hybridomes T. Les tests ont été réalisés sur des complexes CMH II I-E^k/peptide et des I-E^p/peptide purifiés à partir des cellules CH27-E^p-EPM (voir section 3.3). Premièrement, 50 µl d'une dilution sérielle des complexes ont été déposés dans des puits d'un plateau 96 puits en triplicata. Chaque puits a été complété à 200 µl avec du RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Co.) et incubé pendant 16 heures à 37°C. Les puits ont été lavés deux fois avec du milieu frais. Ensuite, 1x10⁵ cellules de l'hybridome T 2.102 ont été ajoutées aux puits. Les plaques ont été incubées 24 heures à 37°C. Afin de vérifier la spécificité de la

réaction, 0,75 µg d'anticorps 14-4-4s servant d'agent bloquant ont été ajoutés aux complexes CMH II I-E^k/peptide et des CMH II I-E^p/peptide avant l'ajout d'hybridomes T 2.102. Après l'incubation, 100 µl de surnageant ont été transférés dans des nouveaux plateaux 96 puits qui ont été congelés à -80°C pendant 1 heure. L'activation des hybridomes T 2.102 et leur production d'IL-2 ont été évaluées à l'aide des CTLL-2, cellules dépendantes de l'IL-2. Un total de 5x10⁴ (100 µl) cellules de CTLL-2 par ml de milieu RPMI-1640 supplémenté de 10% CBS sans 2-ME a été ajouté aux surnageants transférés précédemment. Après une incubation de 16 heures à 37°C, 20 µl par puits (0,4 µCi) de thymidine tritiée (³H Thymine) (ICN Biochemicals) ont été ajoutés aux puits. Les plateaux ont été incubés à 37°C pendant 16 heures supplémentaires. Finalement, l'incorporation de la thymidine radioactive dans l'ADN des CTLL-2 a été mesurée suite à la lyse des cellules et au transfert d'ADN sur des filtres à l'aide de l'appareil «Micro cell harvester». Les filtres ont été analysés à l'aide d'un compteur à scintillation 1450 microBeta Trilux et du logiciel MicroBeta Windows Workstation (Wallac, Boston, MA).

6.2 Criblage des fractions d'HPLC

Le criblage des fractions de HPLC a été effectué par la même méthode. Toutefois, 50 µl de chacune des fractions ont été déposés dans des puits de plaques 96 puits et le solvant a été évaporé sous la hotte à flux laminaire. De plus, 5x10⁴ cellules présentatrices d'antigène CHO-E^k ou CHO-E^p ont été ajoutées aux puits avant d'ajouter 5x10⁴ hybridomes T 2.102. La suite de l'expérience est identique à la méthode décrite à la section 6.1.

7. Analyse en spectrométrie de masse des peptides purifiés

Les peptides contenus dans les fractions ont été concentrés à l'aide d'un SpeedVac. Les analyses ont été effectuées à l'aide de deux spectromètres de masse, le LC MS/MS Q-TRAP (Nanopompe 1100 d'Agilent couplé à un Q-trap 4000 de Applied Biosystem) et le MALDI Q-TOF (Q-TOF Ultima de la compagnie Micromass). Ces

appareils sont sensibles et l'efficacité de la fragmentation dépend de la technique utilisée comme le trappage d'ions ou la technologie de temps de vol (Génome Québec de l'Université McGill, Montréal). Le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) Q-TOF a été le plus utilisé. Les échantillons ont été déposés avec la matrice sur une plaque de métal et le solvant évaporé. Les peptides ont alors été sélectionnés un après l'autre pour poursuivre à l'étape de fragmentation. Les chromatogrammes ont ensuite été analysés pour chacun des peptides fragmentés afin de déterminer la séquence en acides aminés.

RÉSULTATS

1. La purification des molécules du CMH de classe II I-E^k et I-E^p

La chromatographie d'affinité a nécessité l'utilisation d'une grande quantité d'anticorps spécifiques pour la purification des complexes CMH II/peptide. Les anticorps nécessaires ont été produits par le laboratoire à partir d'hybridomes 14-4-4s. L'anticorps 14-4-4s est spécifique pour la chaîne non-polymorphique α des molécules du CMH II I-E donc il est capable de reconnaître à la fois la molécule I-E^k et I-E^p (132). Les anticorps ont été purifiés par chromatographie d'affinité à l'aide d'une résine de sépharose 4B Fast Flow couplée à la protéine G à partir du surnageant d'une culture cellulaire de 1×10^8 cellules. Une quantité moyenne d'anticorps de 0,3 mg a été purifiée par million de cellules.

L'optimisation de la purification des complexes CMH II I-E^k/peptide et/ou CMH II I-E^p/peptide a été faite au cours du projet de maîtrise de Marie-Pascale Gignac, étudiante dans le laboratoire de Claude Daniel (135). La méthode de purification des molécules du CMH I-E^k décrite par Nelson et ses collaborateurs a servi de référence pour l'optimisation de la méthode pour les molécules du CMH II I-E^p (71). Quelques difficultés ont dû être résolues. En effet, les complexes CMH II I-E^p/peptide se sont avérés instables dans le tampon d'élution diéthylamine utilisé pour la purification des complexes CMH II I-E^k/peptide. Il a donc fallu identifier des conditions dans lesquelles l'intégrité des complexes CMH II I-E^p/peptide est conservée. Le tampon d'élution 0,1 M Tris pH 10,6 a été démontré comme étant celui capable de conserver la stabilité des complexes du CMH II I-E^p/peptide lors de l'élution.

Les complexes CMH II/peptide ont été purifiés par chromatographie d'affinité à partir de la lignée cellulaire CH27 sauvage ou transfectée avec une construction permettant d'exprimer constitutivement la molécule du CMH I-E^p. Les cellules ont également été transfectées ou non avec une construction permettant d'exprimer les peptides spécifiques aux molécules du CMH II. Les lignées cellulaires qui ont été utilisées sont CH27, CH27mHEL/Hb(64-76), CH27-E^p et CH27-E^p-EPM. La dernière lignée cellulaire exprime constitutivement l'épitope EPM. Cet épitope a été produit par

l'équipe du Dr. Allen par le criblage d'une banque peptidique combinatoire. L'épitope EPM a été sélectionné comme étant celui capable de stimuler le plus fortement l'hybridome T 2.102. Il a donc été utilisé comme témoin dans le but de vérifier qu'il était bel et bien possible de purifier des peptides naturels par l'approche choisie (120).

Pour la chromatographie d'affinité, environ 2×10^{10} cellules pour chaque lignée cellulaire ont été solubilisées à l'aide des détergents MEGA-8 et MEGA-9 dans un tampon PBS 1X pendant 1 heure à 4°C. Les complexes CMH II/peptide solubilisés ont été adsorbés toute la nuit à 4°C sur les billes de sépharose 4B Fast Flow couplées à l'anticorps 14-4-4s. Les fractions ayant une densité optique à 280 nm plus élevées ont été combinées (Figure 8). Une moyenne de 13 mg de complexes CMH II/peptide par 10^{10} cellules ont été purifiés à partir des différentes lignées cellulaires. Il est important de noter que certaines de ces expériences ont été effectuées avec des billes de sépharose 4 Fast Flow. Cette résine a montré une perte d'efficacité considérable de purification des complexes lorsque la colonne était réutilisée. Le problème a été résolu en remplaçant les billes de sépharose 4 Fast Flow pour des 4B Fast Flow de la même compagnie. Il est également à noter que les quantités de complexes CMH II/peptide purifiés peuvent varier puisqu'il faut tenir compte du fait que certaines lignées cellulaires expriment constitutivement soit les molécules du CMH II I-E^k ou soit les molécules du CMH II I-E^k et I-E^p. Il est donc impossible de comparer la quantité de complexes purifiés à partir des différentes lignées cellulaires.

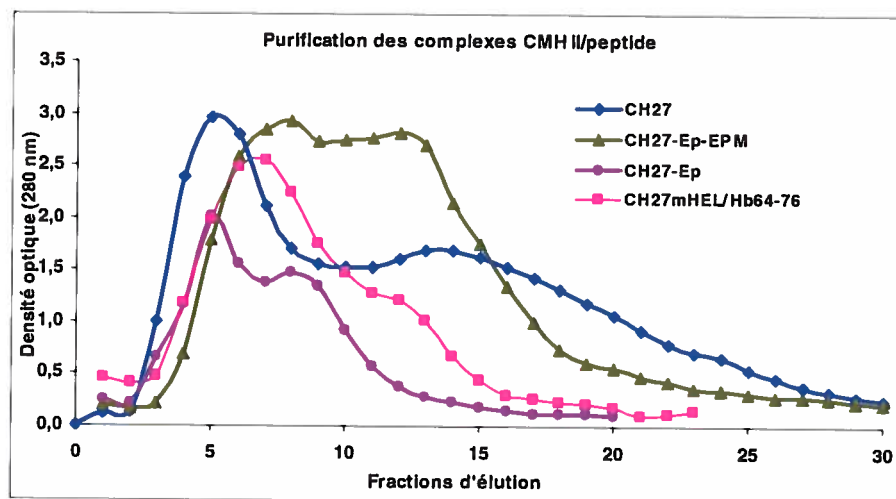


Figure 8: Purification des complexes CMH II I-E^k/peptide et/ou CMH II I-E^p/peptide par chromatographie d'affinité

Chacune des purifications a été effectuée avec les composantes membranaires solubles de 1×10^{10} cellules produites dans un volume total de cinq litres de culture cellulaire avec le tampon d'élution 0.1 M Tris pH 10.6. La densité optique des fractions obtenues suite à l'élution a été mesurée à 280 nm. La limite supérieure du spectrophotomètre est à une D.O. de 3,0.

2. La stabilité des complexes CMH II/peptide

La meilleure méthode de détection des complexes CMH II/peptide stables a été démontrée par une collègue au cours de sa maîtrise (135). La méthode choisie est l'immunoempreinte de type "Western". Cette technique a précédemment été utilisée par l'équipe de Pierce et collaborateurs en utilisant les anticorps 17-3-3s et Y-17 pour la détection de complexes CMH II I-E^k/peptide (136). Nous avons utilisé une technique semblable mais avec l'anticorps 14-4-4s qui est spécifique aux molécules du CMH II I-E. Cet anticorps peut reconnaître les hétérodimères $\alpha\beta$ stables de classe II mais il est incapable de reconnaître les chaînes β dissociées. Les molécules du CMH II stables migrent généralement sous une forme compacte trimérisée, c'est-à-dire formées d'une chaîne α , d'une chaîne β et d'un peptide. La masse moléculaire de ce trimère est d'environ 52 à 56 kDa. Lorsque les complexes deviennent instables par chauffage ou par l'ajout de substances dénaturantes, les chaînes vont migrer sous une forme dissociée. Sous cette forme, les chaînes α et β libres vont migrer à environ 30 kDa (6, 92). Toutefois, seul l'anticorps 17-7-7s est capable de reconnaître à la fois les hétérodimères $\alpha\beta$ et les chaînes libres des molécules du CMH II. Cependant, selon notre expérience, la détection par cet anticorps est beaucoup moins sensible en immunoempreinte de type "Western" que celle par l'anticorps 14-4-4s.

L'analyse des complexes purifiés CMH II I-E^k/peptide et CMH II I-E^p/peptide montre une protéine d'environ 50 kDa qui peut être observée dans toutes les conditions (Figure 9). Cette protéine correspond à la masse moléculaire d'un dimère de molécules du CMH II. Une protéine d'environ 100 kDa correspondant à des dimères de dimères ou aussi appelés superdimères peut également être observée. Pierce et collaborateurs ont démontré que la formation de superdimères de classe II est possible *in vitro*. Ils ont suggéré qu'ils jouent un rôle dans la stabilisation de l'interaction entre les molécules du CMH II et le TCR (92). Le premier puits contenant des complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^p/peptide purifiés sans immunoprécipitation ne nous permet pas de voir les superdimères car ils sont présents en trop faible quantité pour la sensibilité de la méthode.

L'immunoprécipitation a permis de concentrer d'avantage les complexes purifiés et ainsi pouvoir observer des superdimères.

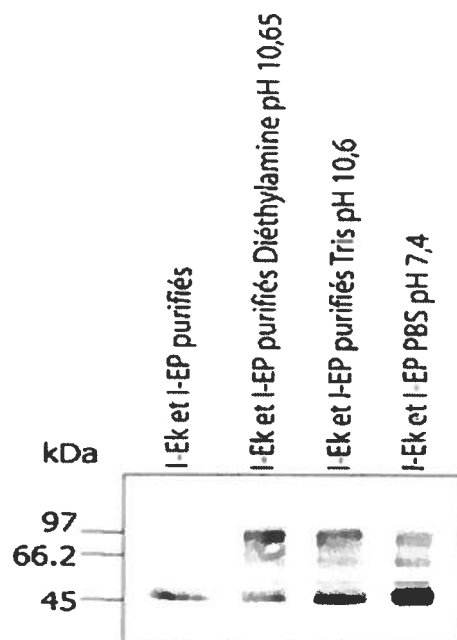


Figure 9: Détection des complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^p/peptide purifiés par immunoempreinte de type « Western »

Une immunoempreinte de type « Western » a été réalisée sur les complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^p/peptide purifiés par chromatographie d'affinité et immunoprécipités avec des billes de sépharose couplées aux anticorps 14-4-4s. Le premier puits a été chargé avec des complexes purifiés seuls sans avoir subi d'immunoprécipitation. Les complexes purifiés dans les autres puits ont été concentrés par immunoprécipitation et incubés ensuite soit avec du tampon PBS 1X pH 7,4, du tampon d'élution 0,1 M Diéthylamine pH 10,65 ou du tampon d'élution 0,1 M Tris pH 10,6, avant d'être chargés sur un gel de polyacrylamide.

On observe que la quantité de protéines correspondante aux complexes CMH II I-E^k/peptide et CMH II I-E^p/peptide incubés en présence du tampon d'élution Tris est plus importante que dans le tampon d'élution diéthylamine. Ce résultat propose la présence de complexes CMH II I-E^p/peptide stables dans le tampon Tris. Ces résultats supportent l'observation précédemment rapportée par Gignac selon laquelle les complexes CMH II I-E^p/peptide sont stables dans le tampon d'élution Tris et instables dans le tampon d'élution diéthylamine. La stabilité des complexes CMH II I-E^p/peptide seuls n'a pas été démontrée directement par cette expérience mais Gignac l'a clairement faite à l'aide de résultats rapportés précédemment (135). À l'aide de cette méthode de détection, nous avons montré à la figure 9 que des complexes CMH II I-E^k/peptide et CMH II I-E^p/peptide stables peuvent être obtenus à l'aide du tampon d'élution Tris lors de la purification par chromatographie d'affinité.

3. Activation des hybridomes T 2.102 par les complexes CMH II I-E^p /peptide purifiés

Cette expérience a été effectuée sur les complexes purifiés par chromatographie d'affinité afin de confirmer l'intégrité fonctionnelle des complexes CMH II I-E^p/peptide. La figure 10 montre le profil de l'activation des hybridomes T 2.102 par les complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^p/peptide purifiés. Des dilutions sérielles des complexes ont tout d'abord été adsorbés au fond des puits à température pièce pendant 16 heures. Pour permettre l'activation des hybridomes T, les peptides doivent être présentés par les molécules du CMH II. Dans cette expérience, les cellules présentatrices d'antigène ne sont pas requises puisque les peptides ont déjà été pris en charge par les molécules du CMH II et qu'ils sont prêts à stimuler directement les hybridomes T 2.102. Il n'est donc pas nécessaire d'avoir de cellules présentatrices d'antigènes pour présenter les peptides aux hybridomes T. La stimulation des hybridomes T par les complexes CMH II I-E^p/peptide a été mesurée à l'aide de la prolifération des CTLL. L'activation des hybridomes T est détectable à aussi peu que 0,33 ug de complexes purifiés (Figure 10). De plus, la spécificité de la reconnaissance a été confirmée par l'inhibition de l'activation lorsque l'anticorps anti-CMH II, 14-4-4s, a été ajouté aux puits.

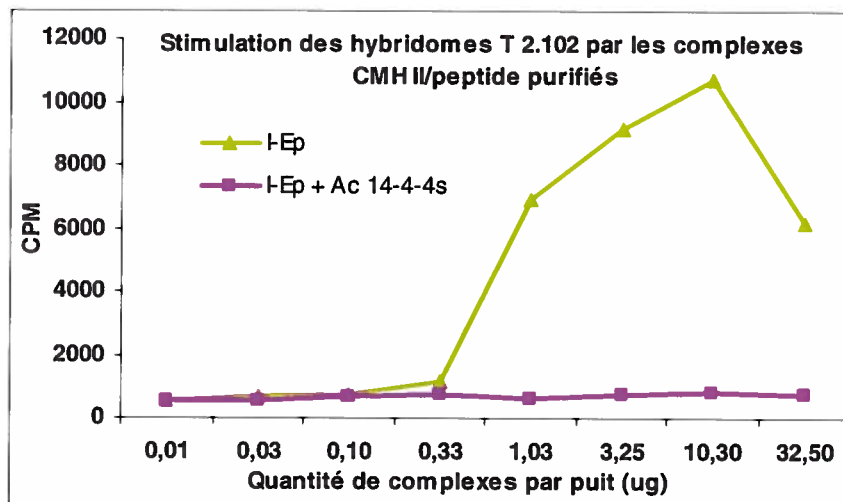


Figure 10: Activation des hybridomes T 2.102 par les complexes CMH II I-E^p/peptide purifiés

Les complexes CMH II I-E^p/peptide purifiés par chromatographie d'affinité à partir des cellules CH27-E^p-EPM ont été adsorbés dans une plaque 96 puits toute la nuit. Après deux lavages, les hybridomes T 2.102 ont été ajoutés et incubés pendant une période de 16 à 18 heures. Par la suite, les cellules dépendantes d'IL-2, les CTLL, ont été mises en présence du surnageant contenant l'IL-2 sécrétée par les hybridomes activés. L'activation des hybridomes T est évaluée par la mesure de la prolifération des CTLL. L'anticorps 14-4-4s a été utilisé comme inhibiteur de l'activation.

4. Analyse des profils des chromatogrammes d'HPLC

Les peptides purifiés à partir des différentes lignées cellulaires telles que CH27, CH27-E^P, CH27mHEL/Hb(64-76) et CH27-E^P-EPM ont été séparés selon leur hydrophobicité par HPLC (Figure 11). Un gradient acide trifluoroacétique/acétonitrile a été utilisé pour séparer les peptides. Les peptides ont été récupérés sous forme de fractions toutes les 30 secondes. Les profils des chromatogrammes d'HPLC sont similaires pour les quatre lignées cellulaires. Toutefois, un décalage est observé pour la lignée cellulaire CH27mHEL/Hb(64-76). Ce phénomène a été probablement causé par une modification dans les solvants utilisés ou dans les manipulations de l'appareil. Compte tenu de l'absence de différences marquées entre les profils, nous ne pouvons pas faire de corrélation entre les profils observés et les peptides présents dans chacune des lignées cellulaires. Les composés présents dans les échantillons et responsables des profils d'absorbances observés peuvent être aussi bien des peptides que des contaminants tels que les détergents provenant de la purification des complexes ou des savons présents dans la vaisselle utilisée. L'absence de la saturation de l'absorbance au début de la séparation des peptides obtenus avec les lignées cellulaires CH27 et CH27-E^P-EPM est le résultat d'un lavage de la colonne avec le solvant A (0,06% de TFA dans de l'eau). Ce lavage a été effectué afin de vérifier que le bruit de fond ne cachait pas des peptides moins abondants. Les lavages n'ont pas été faits par la suite pour les autres échantillons puisque aucun peptide ne semblait être dissimulé par le bruit de fond au début du gradient.

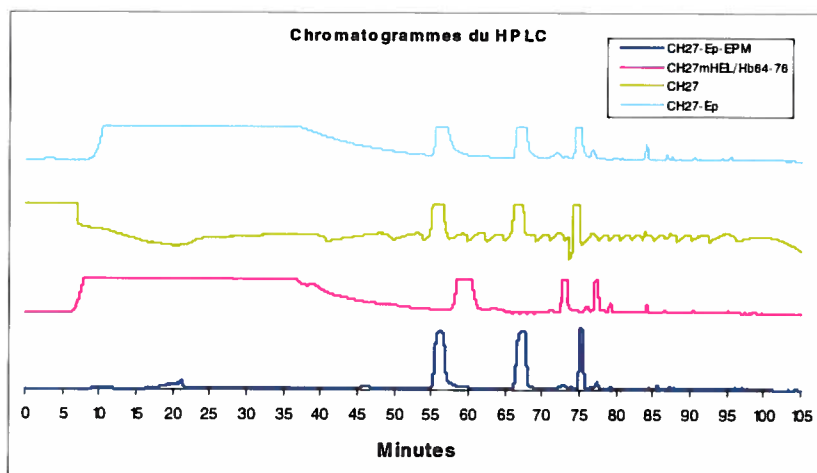


Figure 11: Analyses par HPLC des peptides associés au CMH II obtenus à partir de différentes lignées cellulaires

Les profils des chromatogrammes ont été obtenus par HPLC. Les peptides isolés à partir des différentes lignées cellulaires ont été séparés selon leur hydrophobicité sur une colonne Vydac C₁₈. Les fractions ont été récoltées à toutes les 0,5 min à un débit de 0,5 ml/min. Les peptides ont été détectés à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 214 nm. Pour le reste du document, chaque lignée cellulaire sera représentée par une couleur: CH27; vert, CH27mHEL/Hb(64-76); rose, CH27-E^p; bleu pâle, CH27-E^p-EPM; bleu foncé.

5. Criblage des fractions obtenues par HPLC capables de stimuler l'hybridome T 2.102

Les fractions ont été déposées dans des plaques 96 puits qui ont été laissées sous la hotte à flux laminaire à température pièce toute la nuit afin de permettre l'évaporation du solvant des fractions. Une fois l'évaporation terminée, 5×10^4 cellules présentatrices d'antigène CHO-E^k ou CHO-E^p ainsi que 5×10^4 hybridomes T 2.102 ont été déposés dans chacun des puits contenant les peptides. L'activation des hybridomes T a été mesurée à l'aide des CTLL tel que décrit à la section 6.

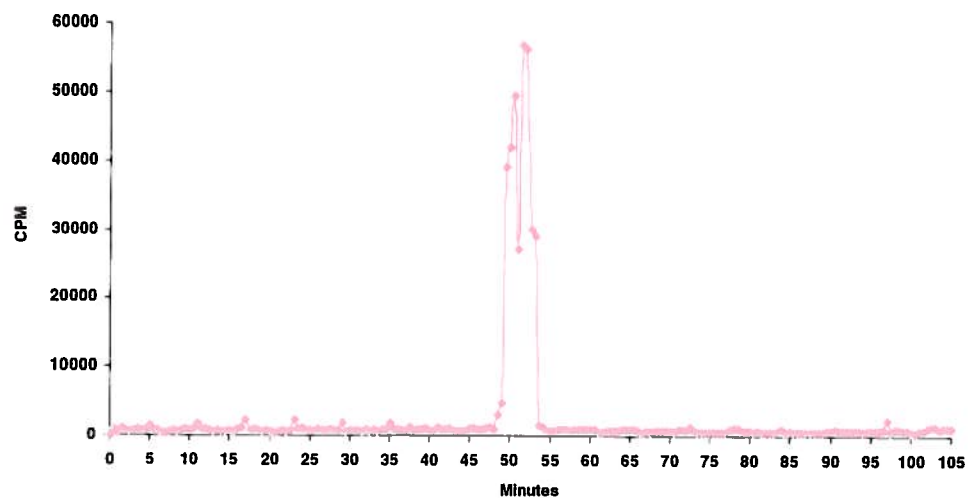
Pour la lignée cellulaire CH27mHEL/Hb(64-76), on observe quelques fractions capables de stimuler l'hybridome T 2.102 lorsque présenté par les cellules CHO-E^k. Comme Vidal et collaborateurs l'ont démontré en 1998 (30), l'activation de l'hybridome T se produit sur un maximum de 10 fractions consécutives (Figure 12A). Les peptides capable de stimuler l'hybridome T 2.102 ont été élués entre 48,5 min et 53,5 min. L'expérience a été effectuée avec la lignée cellulaire CH27mHEL/Hb(64-76) à des fins de contrôle de la méthodologie, principalement au niveau de l'étape de séparation des peptides avec le HPLC. Nous voulions nous assurer qu'il était possible de reproduire les résultats obtenus par une autre équipe et ce, dans les mêmes conditions. Nous avons utilisé comme témoin négatif, la lignée cellulaire CH27 qui a été démontrée comme étant incapable de stimuler l'hybridome T 2.102 (5). Il n'est donc pas étonnant d'observer aucune activité biologique des fractions obtenues par HPLC lorsqu'elles contiennent des peptides présentés par une cellule présentatrice I-E^k (Figure 12B). En comparant ces résultats à ceux obtenus avec la lignée cellulaire CH27mHEL/Hb(64-76), nous pouvons affirmer que les peptides capables de stimuler l'hybridome T contiennent l'épitope Hb(64-76).

Les principales fractions dérivées des cellules CH27-E^p-EPM capables d'activer l'hybridome T 2.102 ont été éluées entre 48 min et 54,5 min, entre 56 min et 59 min et entre 62 min et 66 min (Figure 12C). Les peptides ont été présentés cette fois-ci par des cellules présentatrices d'antigène, CHO-E^p, exprimant les molécules du CMH II I-E^p. En comparant avec les témoins CH27 et CH27mHEL/Hb(64-76), nous pouvons supposer

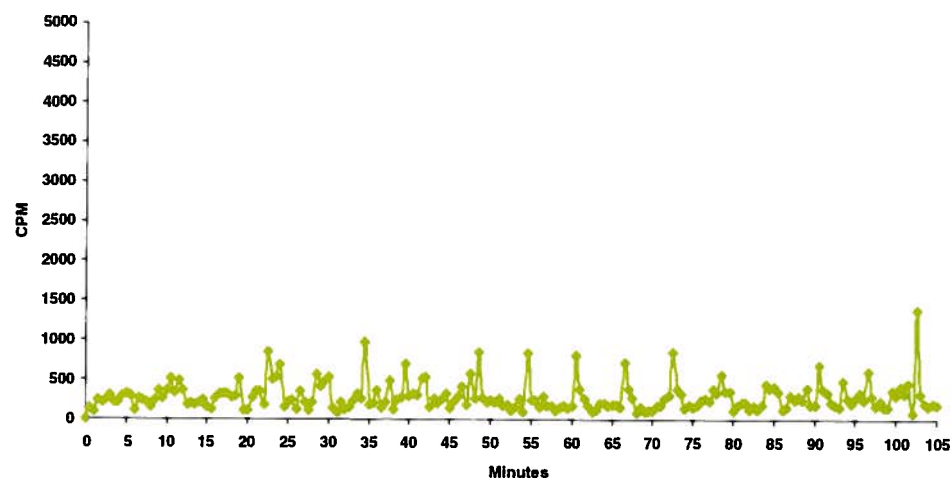
que les trois fractions capables de stimuler l'hybridome T 2.102 contiennent des séquences polypeptidiques composées de l'épitope EPM puisque nous savons que cet épitope est capable de stimuler fortement l'hybridome T 2.102.

Finalement, nous avons effectué l'expérience avec la lignée cellulaire CH27-E^p. Cette lignée exprime les peptides naturels capables de stimuler l'hybridome T 2.102 lorsqu'ils sont présentés par la molécule du CMH II I-E^p. Nous observons des valeurs en CPM très similaires aux résultats obtenus avec le témoin négatif, c'est-à-dire un signal correspondant au bruit de fond (Figure 12D). Toutefois, nous avons obtenu quelques fractions capables de stimuler l'hybridome T 2.102 plus fortement. En effet, nous observons aux environs de 65 minutes une fraction activant à 2500 CPM. Cette valeur est significative puisqu'elle correspond à cinq fois le bruit de fond. Cette valeur plus élevée en CPM semble donc confirmer la présence d'alloptides dans notre échantillon.

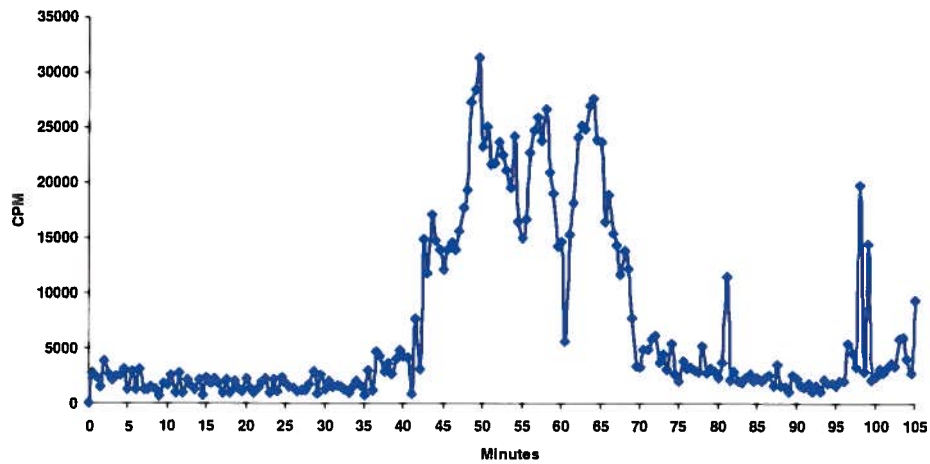
A)



B)



C)



D)

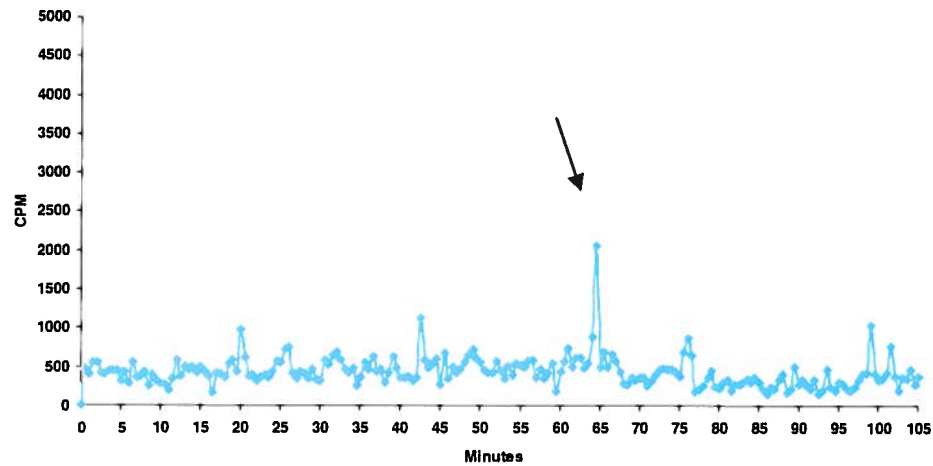


Figure 12: Criblage des fractions d'HPLC possédant une activité stimulatrice des hybridomes T 2.102

Les fractions obtenues par HPLC ont été déposées dans une plaque 96 puits en présence de cellules présentatrices d'antigène CHO-E^k ou CHO-E^p ainsi que les hybridomes T 2.102 pendant 16 à 18 heures. L'activation des hybridomes T 2.102 a été mesurée à l'aide des CTLL dont les valeurs sont représentées en CPM. Profil d'activation des hybridomes T 2.102 obtenu après stimulation avec les peptides purifiés à partir de la lignée cellulaire A) CH27mHEL/Hb(64-76); rose B) CH27; vert C) CH27-E^p-EPM; bleu foncé D) CH27-E^p; bleu pâle.

6. Analyses de spectrométrie de masse

Les trois fractions d'HPLC provenant de la lignée cellulaire CH27-E^P-EPM et correspondantes à la stimulation maximale de l'hybridome T 2.102 ont été analysées en spectrométrie de masse, c'est-à-dire, les fractions à 50,5 min, 58 min et 64 min. Les analyses ont été effectuées à l'aide de deux spectromètres de masse, le LC MS/MS Q-TRAP et le MALDI Q-TOF.

Un total de 21 peptides ont été retrouvés dans les trois fractions dont 6 peptides dans la fraction à 50,5 min (Figure 13A), 8 peptides dans la fraction à 58 min (Figure 14) et 7 peptides dans la fraction à 64 min (Figure 15A). Deux séquences peptidiques ont été identifiées clairement et sans aucune ambiguïté. Un peptide de 13 acides aminés a été identifié dans la fraction 101, GKKVITFSWGSLS (Figure 13B). Ce peptide correspond à l'épitope inséré dans le vecteur d'expression. La deuxième séquence peptidique de 15 acides aminés provient de la fraction 128, GKKVITFSWGSLSGS (Figure 15B). Cette séquence correspond aux 13 acides aminés de l'épitope additionnée d'une glycine et d'une sérine à l'extrémité C-terminale. Ces deux derniers résidus proviennent des acides aminés encodés dans la cassette d'expression du vecteur utilisé pour la transfection des cellules CH27-E^P-EPM.

L'analyse n'a pas été facile puisque la présence importante de détergents dans les échantillons a nui à la détection des peptides avec le spectromètre de masse MS/MS Q-TRAP. Il a été impossible d'analyser avec ce type d'appareil le résultat des fragmentations de peptides. Le MALDI Q-TOF a donc été utilisé puisque ce dernier s'est avéré moins sensible aux détergents lors de l'analyse des peptides. À cause des détergents, seulement 2 peptides sur les 21 peptides analysés ont donc pu être identifiés. La fragmentation des autres peptides n'était pas assez claire pour permettre l'identification d'une séquence de plus de trois acides aminés consécutifs.

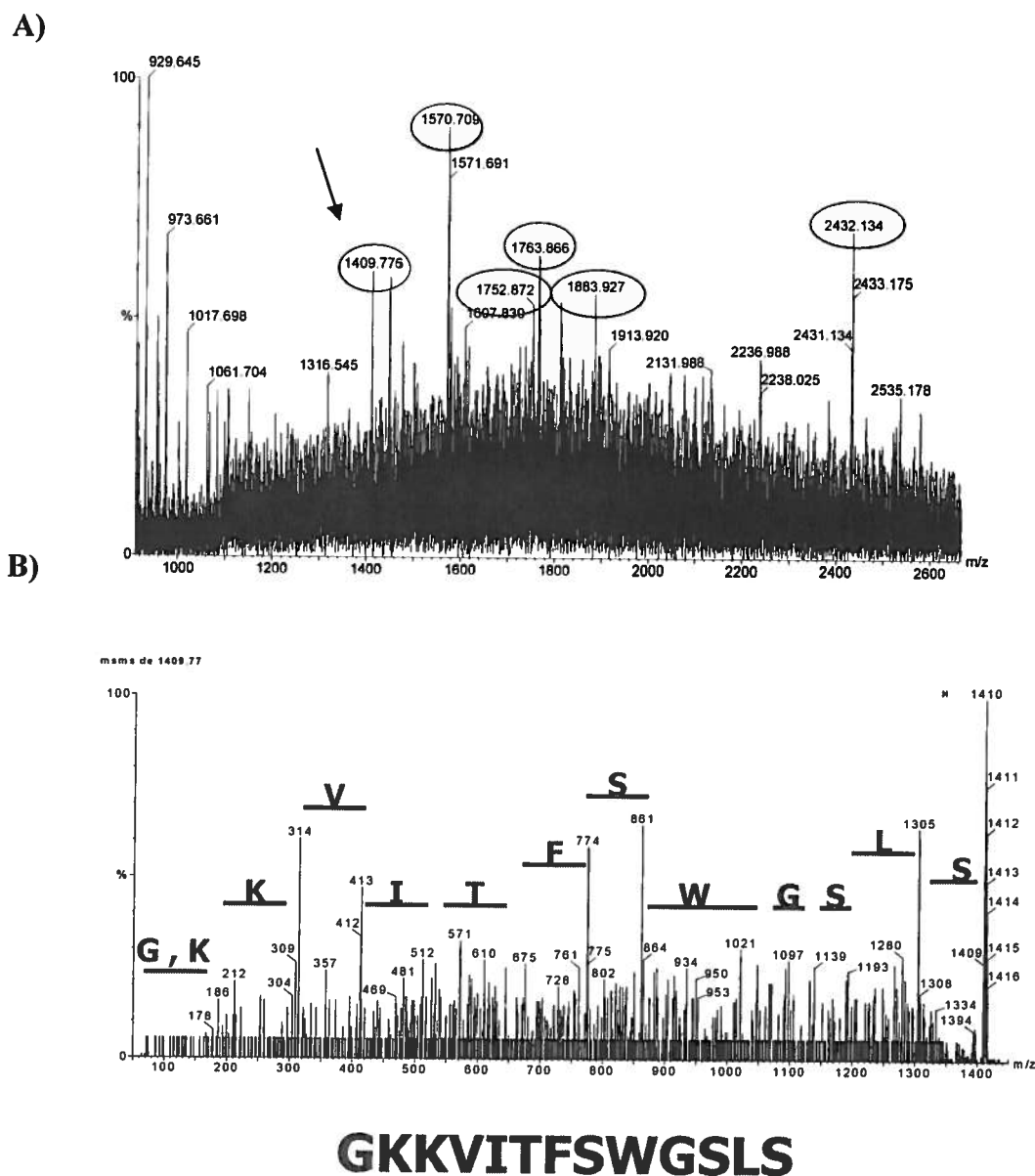


Figure 13: Analyse par spectrométrie de masse de la fraction d'HPLC à 50,5 min

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse MALDI-Q-TOF.

A) Spectre de masse de la fraction obtenue à partir de la lignée cellulaire CH27-E^p-EPM

B) Chromatogramme du peptide fractionné possédant une masse/charge (m/z) de 1409 (indiquée par une flèche noire).

A)

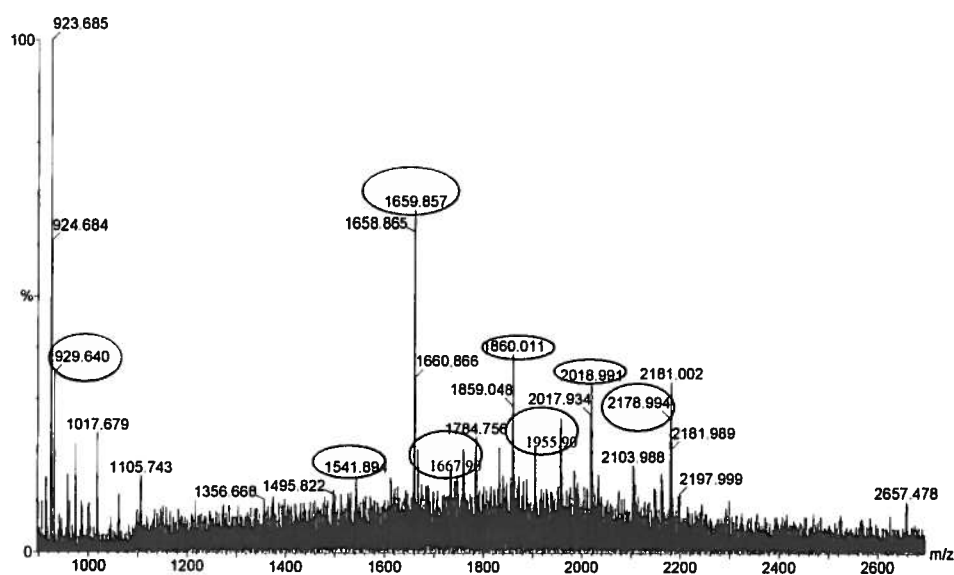
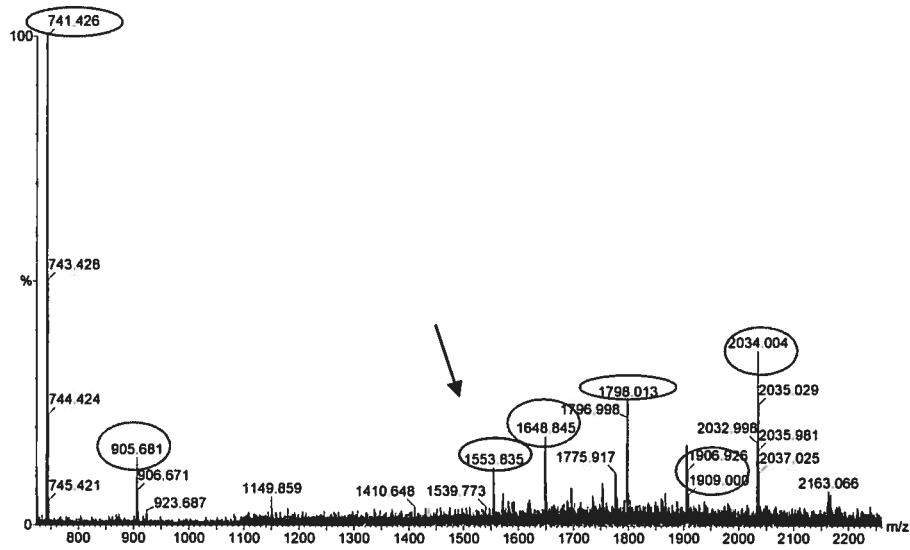


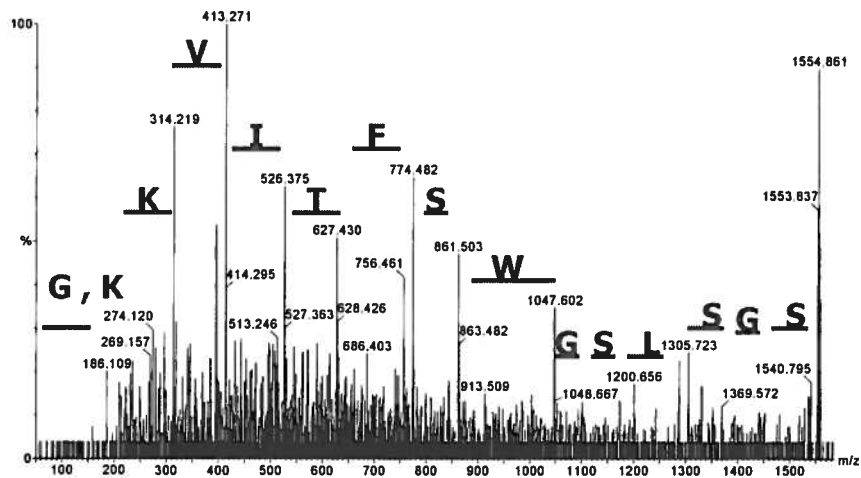
Figure 14: Analyse par spectrométrie de masse de la fraction d'HPLC à 58 min

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse MALDI-Q-TOF.
Spectre de masse de la fraction obtenue à partir de la lignée cellulaire CH27-E^p-EPM

A)



B)



GKKVITFSWGSLSGS

Figure 15: Analyse par spectrométrie de masse de la fraction d'HPLC à 64 min

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse MALDI-Q-TOF.

A) Spectre de masse de la fraction obtenue à partir de la lignée cellulaire CH27-EP-EPM

B) Chromatogramme du peptide fractionné possédant une m/z de 1553 (indiquée par une flèche noire).

DISCUSSION

1. Identification de l'épitope EPM à partir de la lignée cellulaire CH27-E^P-EPM

Dans ce projet, nous avons démontré qu'il était possible d'identifier les peptides naturels exprimés dans une lignée cellulaire murine. Pour ce faire, nous avons d'abord purifiés les anticorps 14-4-4s (132) qui ont été utilisés pour la confection de la colonne de sépharose 4B Fast Flow couplée au CNBr. Cette colonne a servi à la purification des complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^P/peptide. Les complexes ont été élués à l'aide du tampon 0,1 M Tris pH 10,6 ce qui nous a permis de purifier des complexes du CMH II I-E^P/peptide stables (Figure 8-9). Les résultats obtenus par immunoempreinte de type "Western" ont permis d'observer des complexes CMH II stables. Toutefois, pour en être entièrement convaincus, il aurait fallu avoir des complexes CMH II I-E^P/peptide purifiés seuls pour reproduire les résultats obtenus par Gignac (135).

Étant donné que la colonne 14-4-4s utilisés lors de la chromatographie s'est avérée non-réutilisable lorsque produite avec les billes de sépharose 4 Fast Flow au lieu des 4B, il est impossible de faire des corrélations avec les différents niveaux d'expression des complexes CMH II I-E^k/peptide et I-E^P/peptide des différentes lignées cellulaires. Si le nombre exact de cellules solubilisées et la quantité de complexes purifiés avaient été connus pour une même colonne, il aurait été intéressant de comparer les résultats entre eux. Nous aurions alors pu extrapoler sur la quantité de complexes CMH II I-E^k/peptide non désirés dans l'échantillon par rapport aux complexes CMH II I-E^P/peptide recherchés. En effet, étant donné que les deux lignées cellulaires CH27-E^P et CH27-E^P-EPM expriment également des complexes CMH II I-E^k/peptide, l'anticorps 14-4-4s à purifier les complexes CMH II I-E^k/peptide en même temps que les complexes CMH II I-E^P/peptide. Cependant, puisque nous possédons les anticorps 17-3-3s qui sont spécifiques à la chaîne β de I-E^k, nous aurions pu faire une déplétion des complexes CMH II I-E^k/peptide sur une première colonne et purifier les complexes CMH II I-E^P/peptide sur la colonne avec 14-4-4s. Pour ce faire, il aurait tout simplement fallu produire une nouvelle colonne avec l'anticorps 17-3-3s et reprendre l'expérience. Toutefois, il était tout à fait possible de faire l'expérience dans nos conditions puisque les complexes CMH II I-E^k/peptide sont incapables de stimuler l'hybridome T 2.102. De plus, les motifs de liaison

du CMH ainsi que la présentation d'antigène sont spécifiques soit à I-E^k ou I-E^p mais pas aux deux (120). Les peptides présentés par les molécules du CMH II I-E^k ne peuvent donc pas être présentés par les molécules du CMH II I-E^p et vice versa. Donc, le seul endroit où ces complexes pouvaient nuire, c'est au niveau des analyses des peptides par spectrométrie de masse, en augmentant le nombre de peptides différents présents dans chacune des fractions.

Nous avons démontré que les complexes CMH II I-E^p/peptide purifiés sont capables de stimuler l'hybridome T 2.102 et que la reconnaissance est spécifique lorsqu'un anticorps anti-CMH II est ajouté aux puits. Toutefois, il aurait été préférable d'utiliser un autre anticorps que 14-4-4s pour confirmer cette expérience puisque l'anticorps utilisé pour le blocage est le même que l'anticorps utilisé pour la purification des complexes, il est donc attendu que ce qui a été purifié avec cet anticorps soit bloqué par celui-ci. Toutefois dans ce cas-ci, les résultats obtenus sont concluants puisque seulement les complexes purifiés pouvaient stimuler l'hybridome T 2.102. Il existe l'anticorps 2B6.B8 qui est spécifique à la chaîne β de I-E^p (137). Cependant, cet anticorps croise assez fortement avec les molécules du CMH II I-E^k ce qui aurait pu empêcher les complexes CMH II I-E^k de stimuler l'hybridome T 2.102. Toutefois, il a été démontré que ces complexes sont incapables de reconstituer l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 (Figure 10).

Les peptides ont ensuite été séparés par HPLC selon leur hydrophobicité. Nous avons analysé les chromatogrammes obtenus et nous ne pouvons faire aucune corrélation entre les chromatogrammes et les différentes lignées cellulaires. Il serait toutefois possible de changer les paramètres pour observer les valeurs d'absorbance plus faibles qui se retrouvent dans le bruit de fond. Il serait alors peut-être possible de voir des différences plus marquées entre les chromatogrammes que ce que l'on observe (Figure 11).

Suite au criblage des fractions capables de stimuler l'hybridome T 2.102, nous avons pu reproduire des résultats obtenus par l'équipe de Vidal et collaborateurs avec les

peptides purifiés de la lignée cellulaire CH27mHEL/Hb(64-76) (30). Nous avons montré que les peptides capables de stimuler l'hybridome se situent entre 48,5 min et 53 min ce qui représente en fait un décalage de seulement 5 min avec les résultats obtenus par l'autre équipe de chercheurs. Les résultats montrent qu'avec notre méthodologie, nous sommes capable de reproduire les mêmes résultats (Figure 12A). Notre témoin négatif CH27 a montré qu'il était impossible de reconstituer l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 avec des peptides présentés par les molécules du CMH II I-E^k. Il est donc possible d'affirmer que les fractions entre 48 min et 54,5 min, 56 min et 59 min et 62 min à 66 min obtenues à partir des cellules CH27-E^p-EPM contiennent des peptides capables de stimuler l'hybridome T 2.102. Les fractions à 50,5 min, 58 min et 64 min, induisant une stimulation maximale, ont été analysées afin d'identifier les peptides présents. L'étape de l'analyse des peptides présents dans les fractions capables de stimuler l'hybridome T 2.102 a été une étape difficile. Plusieurs appareils différents ont été utilisés puisque chacun des spectromètres de masse a des avantages et des inconvénients. Le problème majeur a été la présence de contaminants, probablement des détergents tels que MEGA-8 et MEGA-9 (Amersham Pharmacia) utilisés lors de la solubilisation des cellules, ou des savons présents dans la verrerie utilisée tout au long des manipulations. Nous avons essayé d'éliminer les contaminants à l'aide d'une colonne Zip-Tip mais sans succès. L'utilisation du spectromètre de masse LC/MS/MS/Q-TRAP ne fut pas un grand succès puisque les contaminants augmentaient considérablement le bruit de fond rendant ainsi la détection des peptides présents dans les fractions impossible. Finalement, les résultats se sont avérés beaucoup plus encourageants suite à l'utilisation d'un spectromètre de masse MALDI-Q-TOF. Cet appareil semblait moins sensible à la présence des contaminants. Malgré la forte concentration de détergents dans les échantillons, nous avons été en mesure d'identifier deux peptides correspondant à l'épitope recherché EPM. Un peptide provient de la fraction à 50,5 min et l'autre à 64 min.

Comme nous le pensions, les deux peptides sont deux formes différentes de l'épitope EPM. En effet, il a été démontré que les séquences peptidiques d'un épitope sont en grande majorité l'épitope en entier additionné d'acides aminés aux extrémités N- ou C-terminales. Par exemple, il a été observé pour l'épitope mHEL/Hb(64-76) lorsque

présenté par les molécules du CMH II I-E^k qu'il pouvait y avoir de un à quatre acides aminés supplémentaires à l'extrémité C-terminale (30). On peut également en retrouver à l'extrémité N-terminale. Nelson et collaborateurs ont rapporté au début des années 1990 que les résidus supplémentaires aux différentes extrémités effectuent des contacts additionnels nécessaires à la stabilité du complexe CMH II/peptide (71). L'équipe a également proposé que ces résidus jouent un rôle important dans l'identité de l'enzyme protéolytique responsable de la création des peptides. La longueur du peptide serait une indication de la durée de la protéolyse enzymatique du polypeptide dans le compartiment protéolytique. Les séquences peptidiques présentées par les molécules du CMH II sont probablement sélectionnées pour leur plus haute affinité pour la molécule du CMH et/ou que ces extrémités supplémentaires facilitent le transport dans la cellule jusqu'à la molécule du CMH (20). Bref, ces observations nous ont permis de spéculer que les deux peptides étaient probablement des formes différentes de l'épitope EPM, ce qui s'est avéré exacte.

L'expérience a également été effectuée avec la lignée cellulaire CH27-E^p dans le but d'identifier des allopeptides naturels. Nous avons observé une stimulation significative de l'hybridome T 2.102 mais trop faible pour que la fraction soit analysée en spectrométrie de masse.

2. Perspectives du projet à court terme

2.1 Reprise des expériences avec CH27-E^p par l'approche protéomique

Les expériences doivent donc être reprises avec la lignée cellulaire CH27-E^p. La purification par chromatographie d'affinité des complexes CMH II I-E^p/peptide se fera avec les billes de sépharose 4B Fast Flow. Le rendement de chaque élution va être ainsi maximal et va permettre de purifier une plus grande quantité de complexes CMH II I-E^p/peptide. Puisque nous avons eu des problèmes majeurs avec des contaminants lors de l'analyse par spectrométrie de masse des procédures particulières vont être prises. La verrerie utilisée sera lavée manuellement et sera rincée avec du méthanol 100%

commercial de qualité HPLC afin d'éliminer tous les contaminants en particulier les savons qui pourraient se retrouver dans les fractions à analyser par spectrométrie de masse. L'eau utilisée au cours des expériences sera également de l'eau commerciale de qualité HPLC afin d'éviter toute source de contamination extérieure. Il faudra également reprendre l'expérience avec une quantité plus importante de cellules pour être en mesure d'obtenir une quantité de peptides assez importante pour être analysée en spectrométrie de masse. Les expériences précédentes ont été effectuées avec environ 2×10^{10} cellules ce qui a donné en test d'activation une valeur de CPM d'environ 2500. En supposant que le niveau d'activation de l'hybridome T 2.102 est proportionnel à la quantité de peptides présents dans les fractions, il faudrait un volume de culture cellulaire 10x plus élevé afin que le compte de 2500 CPM passe à environ 25 000 CPM, tel qu'obtenu avec la lignée cellulaire CH27-E^p-EPM. Il faudrait donc reprendre l'expérience avec environ 2×10^{11} cellules afin d'obtenir une quantité de peptides souhaitables.

2.2. Expérience avec un protocole modifié

Une autre alternative qui est fortement à considérer nécessite la modification du protocole. Suri et collaborateurs ont justement effectué des expériences similaires avec un protocole de purification par chromatographie d'affinité différent (138). Ils ont purifié des peptides naturels présentés par les molécules du CMH II I-A^{g7} et I-A^{g7PD} à partir de lymphomes de souris. Ils n'ont eu besoin que de $2 \text{ à } 8 \times 10^9$ cellules pour y arriver. Ce nouveau protocole éviterait de devoir produire un trop grand volume de culture cellulaire. Au lieu d'éluer les complexes CMH II/peptide avec le tampon 0,1 M Tris pH 10.6, ils ont élué avec 0,1% TFA à pH 1.9. Ils utilisent les mêmes détergents pour la solubilisation des cellules et la purification des complexes que dans notre méthodologie, c'est-à-dire le MEGA-8 et le MEGA-9. L'avantage de leur méthode est qu'ils éliminent les détergents avant d'éluer les complexes CMH II I-E^p/peptide sous une forme dissociée. Tel que mentionné plus haut, la présence de contaminants a rendu l'analyse par spectrométrie de masse assez difficile. Les détergents utilisés pour la solubilisation et la purification sont probablement une des causes de cette contamination. Il serait donc avantageux de pouvoir les éliminer dès le début de l'expérience afin d'éviter des problèmes similaires lors de

l'identification des alloptides isolés. Pour ce faire, Suri et collaborateurs solubilisent les cellules avec 40 mM de MEGA-8 et de MEGA-9 comme dans notre protocole mais au lieu de faire un lavage avec du PBS 1X contenant 10 mM de MEGA-8 et de MEGA-9, ils ont effectué une série de 4 lavages avec des tampons différents. Ils ont effectué des lavages avec une réduction successive des détergents MEGA-8 et de MEGA-9 suivi d'un lavage avec du PBS 1X sans détergent et finalement avec de l'eau distillée. Les lavages servent à éliminer tous les constituants cellulaires outre les complexes du CMH/peptide qui n'ont pas été adsorbés par les anticorps couplés aux billes de sépharose 4B FAST FLOW utilisées pour la chromatographie d'affinité. Ces lavages semblent très efficaces pour éliminer tous les détergents qui pourraient se retrouver dans les fractions d'HPLC et interférer avec l'analyse par spectrométrie de masse de celles-ci (85, 138).

2.3 Confirmation de la présence des alloptides *in vivo*

Une fois les alloptides identifiés, il faudra effectuer l'expérience avec des splénocytes de souris B10.P, cellules exprimant les molécules du CMH II I-E^P afin de vérifier que le ou les peptides naturels identifiés sont bien exprimés *in vivo*. Il faudra un nombre important de rates de souris puisque les cellules qui y sont présentes sont de tailles moins importantes que les lymphomes B de souris ce qui implique une moins grande quantité de complexes exprimés à la surface des cellules. Il faudrait donc de 100 à 375 souris pour obtenir un nombre raisonnable de cellules permettant ainsi d'effectuer l'isolement des peptides exprimés par les molécules du CMH II I-E^P capables de reconstituer l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 (90).

CONCLUSION

L'objectif de ce projet était d'identifier et de caractériser les peptides naturels capables de reconstituer l'alloréactivité du clone de cellule T CD4⁺ 2.102 lorsque présentés par des molécules du CMH II I-E^P de souris. La méthodologie choisie, c'est-à-dire l'approche protéomique, a d'abord été validée à l'aide d'une lignée cellulaire témoin, les CH27-E^P-EPM, exprimant constitutivement le complexe CMH II I-E^P/EPM, un peptide synthétique. Les fractions à 50,5 min, 58 min et 64 min obtenues à partir de la lignée cellulaire CH27-E^P-EPM ont été démontrées comme étant celles capables de stimuler le plus fortement la cellule T 2.102. Ces fractions ont été analysées par spectrométrie de masse. Un peptide dans la fraction à 50,5 min et un dans la fraction à 64 min ont été identifiés. La méthodologie finalement mise au point, l'expérience pourra être effectuée avec la lignée cellulaire CH27-E^P qui exprime les alloligands naturels des molécules du CMH II I-E^P.

L'identification et la caractérisation de ces alloptides naturels vont permettre d'augmenter nos connaissances au niveau des bases moléculaires de l'alloréactivité et permettre de mieux comprendre comment elles peuvent influencer les alloréponses *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

1. Frelinger, J.A., and M. McMillan. 1996. The role of peptide specificity in MHC class I-restricted allogeneic responses. *Immunol Rev* 154:45-58.
2. Crumpacker, D.B., J. Alexander, P. Cresswell, and V.H. Engelhard. 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.
3. Panina-Bordignon, P., G. Corradin, E. Roosnek, A. Sette, and A. Lanzavecchia. 1991. Recognition by class II alloreactive T cells of processed determinants from human serum proteins. *Science* 252:1548-1550.
4. Rotzschke, O., K. Falk, S. Faath, and H.G. Rammensee. 1991. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J Exp Med* 174:1059-1071.
5. Daniel, C., A. Grakoui, and P.M. Allen. 1998a. Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J Immunol* 160:3244-3250.
6. Weenink, S.M., and A.M. Gautam. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol* 75:69-81.
7. Viret, C., and C.A. Janeway, Jr. 1999. MHC and T cell development. *Rev Immunogenet* 1:91-104.
8. 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.
9. Bover, K.H. 1927. Nomoisotransplantation van Epidermis bei einigen Zwillingen. *Beitr. Klin. Chir.* 141:442-447.
10. Gorer, P.A. 1937. The genetic and antigenic basis of tumor transplantation. *J. Pathol. Bacteriol.* 44:691-697.
11. Snell, G.D. 1948. Methods in the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* 49:87-103.
12. Dausset, J. 1958. [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol* 20:156-166.
13. Reiser, J.B., C. Darnault, C. Gregoire, T. Mosser, G. Mazza, A. Kearney, P.A. van der Merwe, J.C. Fontecilla-Camps, D. Housset, and B. Malissen. 2003. CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition. *Nat Immunol* 4:241-247.
14. Kumanovics, A., T. Takada, and K.F. Lindahl. 2003. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev Immunol* 21:629-657.
15. Lechler, R., G. Aichinger, and L. Lightstone. 1996. The endogenous pathway of MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 151:51-79.
16. Little, A.M., and P. Parham. 1999. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet* 1:105-123.
17. Janeway, C.A., Jr., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. 2003. Immunobiologie. De Boeck Université. 1-782 pp.
18. Goldsby, R.A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. 2001. Immunology. 1-670 pp.
19. Revillard, J.-P. 2001. Immunologie. De Boeck Université. 1-595 pp.
20. Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, S.C. Hong, A. Barlow, and C.A. Janeway, Jr. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353:622-627.
21. Hunt, D.F., H. Michel, T.A. Dickinson, J. Shabanowitz, A.L. Cox, K. Sakaguchi, E. Appella, H.M. Grey, and A. Sette. 1992. Peptides presented to the immune

- system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* 256:1817-1820.
22. Ackerman, A.L., and P. Cresswell. 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5:678-684.
 23. Zheng, H., and Z. Li. 2004. Cutting edge: cross-presentation of cell-associated antigens to MHC class I molecule is regulated by a major transcription factor for heat shock proteins. *J Immunol* 173:5929-5933.
 24. Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, M.F. Princiotta, P. Thibault, D. Sacks, and M. Desjardins. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425:402-406.
 25. Nelson, C.A., and D.H. Fremont. 1999. Structural principles of MHC class II antigen presentation. *Rev Immunogenet* 1:47-59.
 26. Dao, C.T., D.A. Weber, and P.E. Jensen. 2002. Analysis of two acidic P6 pocket residues in the pH dependency of peptide binding by I-E(k). *Mol Immunol* 38:1139-1149.
 27. Harton, J.A., and J.P. Ting. 2000. Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression. *Mol Cell Biol* 20:6185-6194.
 28. Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12:259-293.
 29. Kallinteris, N.L., X. Lu, S. Wu, H. Hu, Y. Li, J.V. Gulfo, R.E. Humphreys, and M. Xu. 2003. Ii-Key/MHC class II epitope hybrid peptide vaccines for HIV. *Vaccine* 21:4128-4132.
 30. Vidal, K., C. Daniel, I. Vidavsky, C.A. Nelson, and P.M. Allen. 2000. Hb(64-76) epitope binds in different registers and lengths to I-Ek and I-Ak. *Mol Immunol* 37:203-212.
 31. Brown, J.H., T. Jardetzky, M.A. Saper, B. Samraoui, P.J. Bjorkman, and D.C. Wiley. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332:845-850.
 32. Brown, J.H., T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, L.J. Stern, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.
 33. Sercarz, E.E., and E. Maverakis. 2003. Mhc-guided processing: binding of large antigen fragments. *Nat Rev Immunol* 3:621-629.
 34. Madden, D.R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 13:587-622.
 35. Reche, P.A., and E.L. Reinherz. 2003. Sequence variability analysis of human class I and class II MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms. *J Mol Biol* 331:623-641.
 36. Jones, E.Y. 1997. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 9:75-79.
 37. Rammensee, H.G., T. Friede, and S. Stevanovic. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178-228.
 38. Sant, A.J., N.S. Braunstein, and R.N. Germain. 1987. Predominant role of amino-terminal sequences in dictating efficiency of class II major histocompatibility complex alpha beta dimer expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8065-8069.

39. Nelson, C.A., I. Vidavsky, N.J. Viner, M.L. Gross, and E.R. Unanue. 1997. Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:628-633.
40. Fremont, D.H., D. Monnaie, C.A. Nelson, W.A. Hendrickson, and E.R. Unanue. 1998. Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity* 8:305-317.
41. Fremont, D.H., W.A. Hendrickson, P. Marrack, and J. Kappler. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272:1001-1004.
42. Buerstedde, J.M., L.R. Pease, A.E. Nilson, M.P. Bell, C. Chase, G. Buerstedde, and D.J. McKean. 1988. Regulation of murine MHC class II molecule expression. Identification of A beta residues responsible for allele-specific cell surface expression. *J Exp Med* 168:823-837.
43. Matsumura, M., D.H. Fremont, P.A. Peterson, and I.A. Wilson. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257:927-934.
44. Jardetzky, T.S., J.H. Brown, J.C. Gorga, L.J. Stern, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1996. Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:734-738.
45. Housset, D., G. Mazza, C. Gregoire, C. Piras, B. Malissen, and J.C. Fontecilla-Camps. 1997. The three-dimensional structure of a T-cell antigen receptor V alpha V beta heterodimer reveals a novel arrangement of the V beta domain. *Embo J* 16:4205-4216.
46. Mason, D. 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* 19:395-404.
47. Housset, D., and B. Malissen. 2003. What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity? *Trends Immunol* 24:429-437.
48. Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15:821-850.
49. Seglen, P.O., and P. Bohley. 1992. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* 48:158-172.
50. Pieters, J. 2000. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv Immunol* 75:159-208.
51. Thayer, W.P., L. Ignatowicz, D.A. Weber, and P.E. Jensen. 1999. Class II-associated invariant chain peptide-independent binding of invariant chain to class II MHC molecules. *J Immunol* 162:1502-1509.
52. Villadangos, J.A., R.A. Bryant, J. Deussing, C. Driessen, A.M. Lennon-Dumenil, R.J. Riese, W. Roth, P. Saftig, G.P. Shi, H.A. Chapman, C. Peters, and H.L. Ploegh. 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 172:109-120.
53. Jensen, P.E., D.A. Weber, W.P. Thayer, L.E. Westerman, and C.T. Dao. 1999. Peptide exchange in MHC molecules. *Immunol Rev* 172:229-238.
54. Pessara, U., F. Momburg, and N. Koch. 1988. Cooperative effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the induction of the class II antigen-associated invariant chain expression. *Eur J Immunol* 18:1719-1726.

55. Bijlmakers, M.J., P. Benaroch, and H.L. Ploegh. 1994. Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J Exp Med* 180:623-629.
56. Roche, P.A., M.S. Marks, and P. Cresswell. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354:392-394.
57. Busch, R., and E.D. Mellins. 1996. Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. *Curr Opin Immunol* 8:51-58.
58. Gregers, T.F., B. Fleckenstein, F. Vartdal, P. Roepstorff, O. Bakke, and I. Sandlie. 2003. MHC class II loading of high or low affinity peptides directed by li/peptide fusion constructs: implications for T cell activation. *Int Immunol* 15:1291-1299.
59. Wubbolts, R., and J. Neefjes. 1999. Intracellular transport and peptide loading of MHC class II molecules: regulation by chaperones and motors. *Immunol Rev* 172:189-208.
60. Maenaka, K., and E.Y. Jones. 1999. MHC superfamily structure and the immune system. *Curr Opin Struct Biol* 9:745-753.
61. Bakke, O., and B. Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707-716.
62. Alfonso, C., and L. Karlsson. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 18:113-142.
63. Ullrich, H.J., K. Doring, U. Gruneberg, F. Jahnig, J. Trowsdale, and S.M. van Ham. 1997. Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13163-13168.
64. Engelhard, V.H. 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 12:181-207.
65. Evavold, B.D., J. Sloan-Lancaster, and P.M. Allen. 1994. Antagonism of superantigen-stimulated helper T-cell clones and hybridomas by altered peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2300-2304.
66. Latek, R.R., A. Suri, S.J. Petzold, C.A. Nelson, O. Kanagawa, E.R. Unanue, and D.H. Fremont. 2000. Structural basis of peptide binding and presentation by the type I diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice. *Immunity* 12:699-710.
67. Choi, E., K. McIntyre, R.N. Germain, and J.G. Seidman. 1983. Murine I-A beta chain polymorphism: nucleotide sequences of three allelic I-A beta genes. *Science* 221:283-286.
68. Barber, L.D., and R.I. Lechler. 1991. Interactions between the amino-terminal domains of MHC class II molecules have a profound effect on serologic and T cell recognition: an analysis using recombinant HLA-DR/H-2E molecules. *J Immunol* 147:2346-2353.
69. McDevitt, H. 1995. Evolution of MHC class II allelic diversity. *Immunol Rev* 143:113-122.
70. Sant, A.J., C. Beeson, B. McFarland, J. Cao, S. Ceman, P.W. Bryant, and S. Wu. 1999. Individual hydrogen bonds play a critical role in MHC class II: peptide interactions: implications for the dynamic aspects of class II trafficking and DM-mediated peptide exchange. *Immunol Rev* 172:239-253.

71. Nelson, C.A., R.W. Roof, D.W. McCourt, and 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.
72. Chicz, R.M., R.G. Urban, W.S. Lane, J.C. Gorga, L.J. Stern, D.A. Vignali, and J.L. Strominger. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 358:764-768.
73. Carrasco-Marin, E., J. Shimizu, O. Kanagawa, and E.R. Unanue. 1996. The class II MHC I-Ag7 molecules from non-obese diabetic mice are poor peptide binders. *J Immunol* 156:450-458.
74. Werdelin, O. 1986. Determinant protection. A hypothesis for the activity of immune response genes in the processing and presentation of antigens by macrophages. *Scand J Immunol* 24:625-636.
75. Mouritsen, S., M. Meldal, O. Werdelin, A.S. Hansen, and S. Buus. 1992. MHC molecules protect T cell epitopes against proteolytic destruction. *J Immunol* 149:1987-1993.
76. Germain, R.N., and D.H. Margulies. 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 11:403-450.
77. Buus, S., A. Sette, S.M. Colon, D.M. Jenis, and H.M. Grey. 1986. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 47:1071-1077.
78. Jensen, P.E. 1990. Regulation of antigen presentation by acidic pH. *J Exp Med* 171:1779-1784.
79. Stebbins, C.C., G.E. Loss, Jr., C.G. Elias, A. Chervonsky, and A.J. Sant. 1995. The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J Exp Med* 181:223-234.
80. Babbitt, B.P., G. Matsueda, E. Haber, E.R. Unanue, and P.M. Allen. 1986. Antigenic competition at the level of peptide-Ia binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4509-4513.
81. Rothenhausler, B., K. Dornmair, and H.M. McConnell. 1990. Specific binding of antigenic peptides to separate alpha and beta chains of class II molecules of the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:352-354.
82. Huczko, E.L., W.M. Bodnar, D. Benjamin, K. Sakaguchi, N.Z. Zhu, J. Shabanowitz, R.A. Henderson, E. Appella, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 1993. Characteristics of endogenous peptides eluted from the class I MHC molecule HLA-B7 determined by mass spectrometry and computer modeling. *J Immunol* 151:2572-2587.
83. Buus, S., A. Sette, S.M. Colon, and H.M. Grey. 1988. Autologous peptides constitutively occupy the antigen binding site on Ia. *Science* 242:1045-1047.
84. Lavoie, P.M., H. McGrath, N.H. Shoukry, P.A. Cazenave, R.P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2001. Quantitative relationship between MHC class II-superantigen complexes and the balance of T cell activation versus death. *J Immunol* 166:7229-7237.

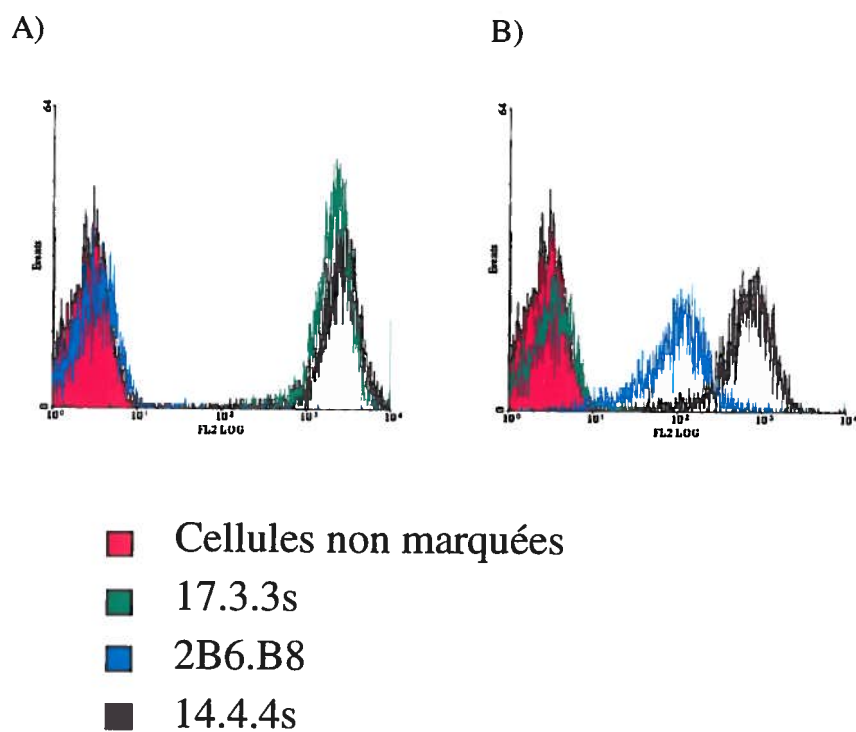
85. Nelson, C.A., N.J. Viner, and E.R. Unanue. 1996. Appreciating the complexity of MHC class II peptide binding: lysozyme peptide and I-Ak. *Immunol Rev* 151:81-105.
86. Srinivasan, M., E.W. Marsh, and S.K. Pierce. 1991. Characterization of naturally processed antigen bound to major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7928-7932.
87. Slingluff, C.L., Jr., T.A. Colella, L. Thompson, D.D. Graham, J.C. Skipper, J. Caldwell, L. Brinckerhoff, D.J. Kittlesen, D.H. Deacon, C. Oei, N.L. Harthun, E.L. Huczko, D.F. Hunt, T.L. Darrow, and V.H. Engelhard. 2000. Melanomas with concordant loss of multiple melanocytic differentiation proteins: immune escape that may be overcome by targeting unique or undefined antigens. *Cancer Immunol Immunother* 48:661-672.
88. Zarling, A.L., S.B. Ficarro, F.M. White, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 2000. Phosphorylated peptides are naturally processed and presented by major histocompatibility complex class I molecules in vivo. *J Exp Med* 192:1755-1762.
89. Choppin, J., F. Martinon, E. Gomard, E. Bahraoui, F. Connan, M. Bouillot, and J.P. Levy. 1990. Analysis of physical interactions between peptides and HLA molecules and application to the detection of human immunodeficiency virus 1 antigenic peptides. *J Exp Med* 172:889-899.
90. Marrack, P., L. Ignatowicz, J.W. Kappler, J. Boymel, and J.H. Freed. 1993. Comparison of peptides bound to spleen and thymus class II. *J Exp Med* 178:2173-2183.
91. Samaan, A., J. Thibodeau, W. Mahana, F. Castellino, P.A. Cazenave, and T.J. Kindt. 1999. Cellular distribution of a mixed MHC class II heterodimer between DRalpha and a chimeric DObeta chain. *Int Immunol* 11:99-111.
92. Schafer, P.H., S. Malapati, K.K. Hanfelt, and S.K. Pierce. 1998. The assembly and stability of MHC class II-(alpha beta)₂ superdimers. *J Immunol* 161:2307-2316.
93. Conant, S.B., and R.H. Swanborg. 2003. MHC class II peptide flanking residues of exogenous antigens influence recognition by autoreactive T cells. *Autoimmun Rev* 2:8-12.
94. Huang, J.C., M. Han, A. Minguela, S. Pastor, A. Qadri, and E.S. Ward. 2003. T cell recognition of distinct peptide:I-Au conformers in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 171:2467-2477.
95. Kasson, P.M., J.D. Rabinowitz, L. Schmitt, M.M. Davis, and H.M. McConnell. 2000. Kinetics of peptide binding to the class II MHC protein I-Ek. *Biochemistry* 39:1048-1058.
96. Eisenbach, L., E. Bar-Haim, and K. El-Shami. 2000. Antitumor vaccination using peptide based vaccines. *Immunol Lett* 74:27-34.
97. Engelhard, V.H., T.N. Bullock, T.A. Colella, S.L. Sheasley, and D.W. Mullins. 2002. Antigens derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188:136-146.
98. Perreault, C., D.C. Roy, and C. Fortin. 1998. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol Today* 19:69-74.

99. Hambach, L., and E. Goulmy. 2005. Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol* 17:202-210.
100. Falkenburg, J.H., and R. Willemze. 2004. Minor histocompatibility antigens as targets of cellular immunotherapy in leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 17:415-425.
101. Chao, N.J. 2004. Minors come of age: Minor histocompatibility antigens and graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 10:215-223.
102. Perreault, C., J. Jutras, D.C. Roy, J.G. Filep, and S. Brochu. 1996. Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 98:622-628.
103. Fontaine, P., G. Roy-Proulx, L. Knafo, C. Baron, D.C. Roy, and C. Perreault. 2001. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med* 7:789-794.
104. Kotzampasaki, E.M., M.S. Spyropoulou-Vlachou, C. Kalofoutis, V. Vrani, A. Kalofoutis, and C. Stavropoulos-Giokas. 2004. Minor histocompatibility antigen HA-1 and HPA-5 polymorphisms in HLA-identical related bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 36:1735-1738.
105. Cai, J., J. Lee, E. Jankowska-Gan, R. Derks, J. Pool, T. Mutis, E. Goulmy, and W.J. Burlingham. 2004. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8⁺ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J Exp Med* 199:1017-1023.
106. Cavanagh, G., C.E. Chapman, V. Carter, A.M. Dickinson, and P.G. Middleton. 2005. Donor CD31 genotype impacts on transplant complications after human leukocyte antigen-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 79:602-605.
107. Skipper, J.C., R.C. Hendrickson, P.H. Gulden, V. Brichard, A. Van Pel, Y. Chen, J. Shabanowitz, T. Wolfel, C.L. Slingluff, Jr., T. Boon, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 1996. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183:527-534.
108. Malarkannan, S., M. Afkarian, and 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.
109. Sherman, L.A., and S. Chattopadhyay. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 11:385-402.
110. Whitelegg, A., and L.D. Barber. 2004. The structural basis of T-cell allorecognition. *Tissue Antigens* 63:101-108.
111. Pawelec, G., M. Adibzadeh, S. Bornhak, H. Friccius, T. Halder, H. Kalbacher, K. Li, H. Max, C. Muller, D. Sansom, F. Thiel, and J. Zeuthen. 1996. The role of endogenous peptides in the direct pathway of alloreactivity to human MHC class II molecules expressed on CHO cells. *Immunol Rev* 154:155-173.
112. Dellabona, P., B.Y. Wei, N. Gervois, C. Benoist, and D. Mathis. 1991. A single amino acid substitution in the Ak molecule fortuitously provokes an alloresponse. *Eur J Immunol* 21:209-213.

113. Rogers, N.J., and R.I. Lechler. 2001. Allorecognition. *Am J Transplant* 1:97-102.
114. Lechler, R.I., and J.R. Batchelor. 1982. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 155:31-41.
115. Vella, J.P., C. Magee, L. Vos, K. Womer, H. Rennke, C.B. Carpenter, W. Hancock, and M.H. Sayegh. 1999. Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation* 67:1523-1532.
116. Kisielow, P., and H. von Boehmer. 1995. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol* 58:87-209.
117. Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 84:521-529.
118. Lechler, R.I., G. Lombardi, J.R. Batchelor, N. Reinsmoen, and F.H. Bach. 1990. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 11:83-88.
119. Mendiratta, S.K., J.P. Kovalik, S. Hong, N. Singh, W.D. Martin, and L. Van Kaer. 1999. Peptide dependency of alloreactive CD4⁺ T cell responses. *Int Immunol* 11:351-360.
120. Daniel, C., S. Horvath, and P.M. Allen. 1998b. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 8:543-552.
121. Luescher, I.F., P.M. Allen, and E.R. Unanue. 1988. Binding of photoreactive lysozyme peptides to murine histocompatibility class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:871-874.
122. Sanderson, S., D.J. Campbell, and N. Shastri. 1995. Identification of a CD4⁺ T cell-stimulating antigen of pathogenic bacteria by expression cloning. *J Exp Med* 182:1751-1757.
123. Fremont, D.H., S. Dai, H. Chiang, F. Crawford, P. Marrack, and J. Kappler. 2002. Structural basis of cytochrome c presentation by IE(k). *J Exp Med* 195:1043-1052.
124. Viner, N.J., C.A. Nelson, and E.R. Unanue. 1995. Identification of a major I-Ek-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.
125. Robadey, C., H.J. Wallny, and S. Demotz. 1996. Cell type-specific processing of the I-Ed-restricted hen egg lysozyme determinant 107-116. *Eur J Immunol* 26:1656-1659.
126. Wallny, H.J., G. Sollami, and K. Karjalainen. 1995. Soluble mouse major histocompatibility complex class II molecules produced in Drosophila cells. *Eur J Immunol* 25:1262-1266.
127. Spencer, J.S., J.H. Freed, and R.T. Kubo. 1993. Expression and function of mixed isotype MHC class II molecules in normal mice. *J Immunol* 151:6822-6832.
128. Takami, K., K. Ogasawara, Y. Itoh, K. Kajino, H. Naruse, and K. Onoe. 1994. Determination of the agretopic residues of a peptide co-restricted to different class II isotypes, I-Au and I-Eu, and its application for preparation of a synthetic peptide vaccine against influenza virus A/Aichi/2/68. *Microbiol Immunol* 38:779-787.

129. Evavold, B.D., S.G. Williams, B.L. Hsu, S. Buus, and P.M. Allen. 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.
130. Lorenz, R.G., and P.M. Allen. 1988. Direct evidence for functional self-protein/Ia-molecule complexes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5220-5223.
131. Wettstein, D.A., J.J. Boniface, P.A. Reay, H. Schild, and M.M. Davis. 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* 174:219-228.
132. Ozato, K., N. Mayer, and D.H. Sachs. 1980. Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens. *J Immunol* 124:533-540.
133. Vidal, K., B.L. Hsu, C.B. Williams, and P.M. Allen. 1996. Endogenous altered peptide ligands can affect peripheral T cell responses. *J Exp Med* 183:1311-1321.
134. Haughton, G., L.W. Arnold, G.A. Bishop, and T.J. Mercolino. 1986. The CH series of murine B cell lymphomas: neoplastic analogues of Ly-1+ normal B cells. *Immunol Rev* 93:35-51.
135. Gignac, M.-P. 2003. Purification et caractérisation des complexes I-E^p/peptides stables. 1-112 pp.
136. Schafer, P.H., S.K. Pierce, and T.S. Jardetzky. 1995. The structure of MHC class II: a role for dimer of dimers. *Semin Immunol* 7:389-398.
137. Larocque, S. 2004. Modulation du rejet greffe par des peptides antagonistes.
138. Suri, A., I. Vidavsky, K. van der Drift, O. Kanagawa, M.L. Gross, and E.R. Unanue. 2002. In APCs, the autologous peptides selected by the diabetogenic I-Ag7 molecule are unique and determined by the amino acid changes in the P9 pocket. *J Immunol* 168:1235-1243.

ANNEXES



Annexe 1: 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 (bleu) a été analysée en cytométrie A) CHO-E^k B) CHO-E^p (137)