

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**PRODUCTION ET CARACTÉRISATION D'UN RÉCEPTEUR DE CELLULE T  
SOUS LA FORME D'UNE CHAÎNE UNIQUE SOLUBLE.**

Par  
Katy Perron

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

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

Alain Lamarre, INRS–Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Nathalie Labrecque, Centre de recherche Guy-  
Bernier (HMR)

Directeur de recherche

Claude Daniel, INRS–Institut Armand-Frappier

## Résumé

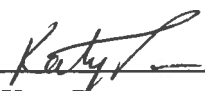
Encore très peu de TCR ont été cristallographiés depuis les vingt dernières années, moment de découverte du récepteur des cellules T. Cette déficience se fait ressentir dans l'étendue des connaissances sur la molécule et les interactions avec ses ligands. Ce lent départ dans le développement de la caractérisation du TCR est principalement dû à la difficulté à obtenir le TCR dans une forme soluble. L'existence uniquement membranaire et la difficulté de pairage des chaînes sont les obstacles principaux à la production de TCR sous une forme soluble.

La production du TCR 2.102 pourrait permettre à long terme l'ajout de notions supplémentaires sur le récepteur des cellules T. Cela permettrait également de peaufiner le modèle d'étude des mécanismes de rejets de greffes basé sur la cellule T 2.102. Le présent projet de recherche vise donc à long et moyen terme, la poursuite des objectifs précédents en ayant comme défi immédiat la production du TCR 2.102 dans une forme soluble.

Trois approches ont été utilisées pour la production du TCR 2.102 sous la forme d'une chaîne unique soluble mais une seule a permis d'atteindre les l'objectifs. La production en fusion avec la thioréoxineA chez *E. coli* n'a pas permis de retrouver le TCR 2.102 dans la fraction soluble. De plus, il a été impossible de purifier le TCR 2.102 en fusion avec la protéine NusA, obtenu dans la fraction soluble suite à l'expression chez *E. coli*. C'est la production du TCR 2.102 ancré à la membrane de cellule de mammifère par un lien GPI qui a permis de récupérer celui-ci sous une forme soluble. Suite au clivage du lien GPI par une enzyme spécifique (la PI-PLC), le TCR 2.102 a été purifié à l'aide d'une chromatographie d'affinité aux métaux chélatés grâce à la présence d'un marqueur de six histidines ajouté lors de la construction du vecteur d'expression. Le TCR 2.102 soluble a ensuite été testé de deux différentes façons pour s'assurer qu'il

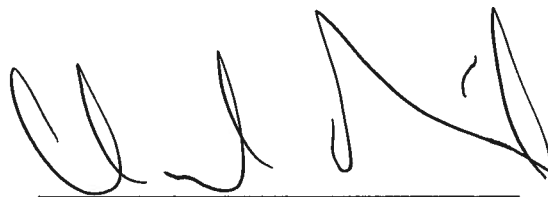
reconnaissait ses ligands. La détection par cytométrie en flux de la reconnaissance des ligands, présentés par des cellules, n'a pas été concluante. Le test de compétition d'activation de cellule T, où le TCR soluble est le compétiteur, a donné des résultats préliminaires très intéressants. Il semble que la présence du TCR 2.102 soluble puisse inhiber l'activation de l'hybridome T 2.102 mais des expérimentations supplémentaires devraient être réalisées.

Un important problème de stabilité d'expression par les cellules de mammifère s'est traduit en de faibles rendements de TCR 2.102 solubles purifiés. Ces mauvais rendements ont considérablement affecté les tests de caractérisation. Il serait impératif d'améliorer le système d'expression de façon à permettre de meilleurs rendements et par le fait même des tests plus complets et significatifs.



---

Katy Perron



---

Claude Daniel, directeur de recherche

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Claude Daniel, mon directeur de recherche, pour m'avoir supporté et guidé au cours de ce projet de recherche. Je voudrais également souligner les discussions tant scientifiques que sociales que j'ai eu avec les filles du labo et qui ont rendu très agréable mes heures au labo. Sans oublier Yvon, qui m'a enseigné l'importance d'un syndicat dans l'avenir d'un emploi permanent pour une jeune diplômée comme moi!

Ces mois passés à l'Institut n'auraient pas été aussi plaisant sans toutes les activités auxquelles j'ai participées avec assiduité. Les fins de semaine de plein air et les 5 à 7 ont été de très bonnes soupapes d'évacuation et m'ont permis de rencontrer des amis que j'espère côtoyer encore longtemps. Je m'y suis même découvert un goût pour le hockey bottine!!!

J'y ai également rencontré l'homme avec qui je partage ma vie, mon amoureux et ami Pascal. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir supporté pendant la rédaction et de m'avoir rassuré sur la motivation que l'on y trouvait étant lui-même passer par cette étape!!!

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>II</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 La cellule T.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Le développement de la cellule T .....	5
1.1.1.1 Sélection thymique.....	6
1.1.1.2 Orientation dans la lignée CD4 ou CD8 .....	7
1.1.2 Le rôle de la cellule T.....	8
<b>1.2 Le TCR.....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Découverte du TCR.....	9
1.2.2 Les gènes du TCR $\alpha$ : $\beta$ .....	10
1.2.2.1 Plusieurs chaînes mais un seul TCR .....	14
1.2.3 La structure du TCR $\alpha$ : $\beta$ .....	14
1.2.3.1 Association avec d'autres protéines.....	15
<b>1.3 Reconnaissance du ligand.....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Ligands du TCR .....	17
1.3.1.1 Grande variabilité des molécules du CMH .....	21
1.3.2 Interaction TCR /pCMH.....	21
1.3.2.1 Le contact physiologique.....	26
<b>1.4 Production de TCR chimériques.....</b>	<b>28</b>
<b>1.5 Modele basé sur la cellule T 2.102.....</b>	<b>31</b>
1.5.1 Le TCR 2.102.....	31
<b>2 MATÉRIEL &amp; MÉTHODES .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Cellules.....</b>	<b>36</b>
2.1.1 Souches de <i>E. coli</i> .....	36
2.1.2 Cellules de mammifère.....	36
<b>2.2 Vecteurs .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3 Anticorps.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4 Oligonucléotides.....</b>	<b>40</b>
<b>2.5 Modification de l'ADN .....</b>	<b>40</b>

2.5.1	Digestion avec des enzymes de restrictions.....	40
2.5.2	PCR .....	40
2.5.3	Ligation.....	43
2.5.3.1	Déphosphorylation/Phosphorylation (kinase) .....	43
<b>2.6</b>	<b>Transformation de l'ADN dans <i>E. coli</i></b> .....	<b>44</b>
2.6.1	Préparation des bactéries compétentes .....	44
2.6.2	Transformation par électroporation.....	44
<b>2.7</b>	<b>Analyse de l'ADN.....</b>	<b>45</b>
2.7.1	Électrophorèse sur gel d'agarose .....	45
2.7.2	Séquençage de l'ADN .....	45
<b>2.8</b>	<b>Construction des vecteurs .....</b>	<b>45</b>
2.8.1	sc2.102/pET-32b .....	46
2.8.1.1	sc2.102(Nco I)/pSK- .....	46
2.8.1.2	Sous-clonage dans pET-32b .....	46
2.8.2	sc2.102/pET43.1b .....	48
2.8.2.1	sc2.102(Sma I)/pSK-.....	48
2.8.2.2	Sous-clonage dans pET-43.1b .....	48
2.8.3	sc2.102PLAP/pcDNA3.1.....	48
2.8.3.1	sc2.102L/pSK- .....	48
2.8.3.2	sc2.102RGS6H/pSK- .....	50
2.8.3.3	sc2.102PLAP/pSK- .....	50
2.8.3.4	Sous-clonage dans pcDNA3.1 .....	50
<b>2.9</b>	<b>Expression du scTCR2.102.....</b>	<b>53</b>
2.9.1	Induction à l'IPTG chez <i>E. coli</i> .....	53
2.9.2	Transfection des cellules de mammifère avec la Lipofectamine 2000 .....	53
<b>2.10</b>	<b>Purification du scTCR.....</b>	<b>53</b>
2.10.1	Séparation des fractions solubles et insolubles chez <i>E. coli</i> .....	53
2.10.2	Clivage enzymatique .....	54
2.10.2.1	Thrombine .....	54
2.10.2.2	PI-PLC.....	54
2.10.3	Immunoprécipitation .....	54
2.10.4	Chromatographie d'affinité avec chélation de métaux (nickel).....	55
2.10.5	Concentration.....	56
<b>2.11</b>	<b>Analyse des protéines.....</b>	<b>56</b>
2.11.1	Dosage .....	56
2.11.1.1	Dosage aux U.V.....	56
2.11.1.2	Dosage colorimétrique (Lowry) .....	56
2.11.2	SDS-PAGE .....	56
2.11.3	Coloration au bleu brillant de coomassie R250.....	57
2.11.4	Immunoempreinte de type Western .....	57
2.11.5	Marquage en cytométrie en flux .....	58
<b>2.12</b>	<b>Test de fonctionnalité du sc2.102 .....</b>	<b>58</b>
2.12.1	Multimérisation du sc2.102 .....	58
2.12.1.1	sc2.102-Anticorps .....	58
2.12.1.2	sc2.102-billes .....	59
2.12.2	Test de compétition d'activation d'hybridome T.....	59

<b>3</b>	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>61</b>
3.1	Expression du sc2.102 en fusion avec la thiorédoxine .....	62
3.2	Expression du sc2.102 en fusion avec NusA.....	66
3.3	Purification du sc2.102 en fusion avec NusA .....	70
3.3.1	Clivage du sc2.102 de NusA .....	70
3.3.2	Immunoprécipitation de NusA (sélection négative) .....	72
3.4	Expression du sc2.102 lié à la membrane par un lien GPI.....	72
3.4.1	Expression transitoire .....	75
3.4.2	Expression à long terme (stable).....	75
3.5	Purification du sc2.102 lié à la membrane par un lien GPI .....	77
3.5.1	Clivage du sc2.102 de la membrane.....	77
3.5.2	Purification du sc2.102 par chromatographie .....	80
3.6	Caractérisation du sc2.102 produit.....	80
3.6.1	Reconnaissance en cytométrie en flux .....	80
3.6.2	Compétition d'activation d'hybridome T 2.102 .....	82
<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>86</b>
4.1	Expression chez <i>E. coli</i> .....	87
4.2	Expression avec un lien GPI.....	89
4.3	Tests d'activité biologique .....	91
	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>94</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>96</b>

## Liste des figures

Figure 1. Structure des gènes.	12
Figure 2. Schéma du complexe TCR :CD3.	16
Figure 3. Schéma des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II.	19
Figure 4. Nombre cumulatif de structure de CMH, de TCR et de complexes TCR/pCMH cristallographiés au cours des années.	22
Figure 5. Complexe TCR/pCMH.	24
Figure 6. Schéma de la synapse immunologique.	27
Figure 7. Schéma de la construction du vecteur sc2.102/pET-32b.	47
Figure 8. Schéma de la construction du vecteur sc2.102/pET-43.1b.	49
Figure 9. Schéma de la construction du vecteur sc2.102PLAP/pcDNA3.1.	51
Figure 10. Organisation de la séquence du sc2.102 en fusion avec la thiorédoxineA.	63
Figure 11. Expression du sc2.102 en fusion avec la thiorédoxine.	64
Figure 12. Organisation de la séquence du sc2.102 en fusion avec NusA.	67
Figure 13. Expression du sc2.102 en fusion avec NusA.	68
Figure 14. Clivage du sc2.102 de la protéine NusA.	71
Figure 15. Immunoprécipitation de NusA.	73
Figure 16. Organisation de la séquence du sc2.102 en fusion avec une séquence permettant le transfert d'un lien GPI.	74
Figure 17. Expression transitoire du sc2.102PLAP.	76
Figure 18. Instabilité d'expression du sc2.102PLAP dans le temps.	78
Figure 19. Clivage du sc2.102 de la surface cellulaire.	79



Figure 20. Purification du sc2.102 par chromatographie d'affinité.	81
Figure 21. Analyse de la réactivité du sc2.102 soluble par cytométrie en flux.	83
Figure 22. Test de compétition d'activation d'hybridome T2.102.	85

## Liste des Tableaux

Tableau 1. Liste des TCR $\alpha\beta$ cristallographiés.	30
Tableau 2. Détails des différentes souches de <i>E. coli</i> utilisées.	37
Tableau 3. Détails des différentes cellules de mammifère utilisées.	38
Tableau 4. Détails des différents vecteurs utilisés.	39
Tableau 5. Liste des anticorps utilisés.	41
Tableau 6. Liste des oligonucléotides utilisés.	42

## Liste des abréviations

°C	degré Celcius
2-ME	2-β-mercaptoéthanol
Ac	anticorps
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	acide déoxyribonucléique complémentaire
ATP	adénine triphosphate
b	bases
BGH	hormone croissance bovine
C	constant
CDR	région déterminant la complémentarité
Ci	Curie (unité radioactivité)
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CTP	cytosine triphosphate
<i>D</i>	diversité
Da	Dalton
EDTA	éthylène diamine tétraacétate
<i>g</i>	force gravitationnelle
G	glycine
<i>g</i>	gramme
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GTP	guanine triphosphate
H	histidine
HLA	antigène humain de leucocytes
IgG	immunoglobuline de type G
IL-2	interleukine-2
IMF	intensité moyenne de fluorescence
IPTG	isopropyle β-D-thiogalctopyranoside
ITAMs	motif d'activation de récepteur immunologique dépendant de la tyrosine
<i>J</i>	jonction
l	litre
m	mètre
M	molaire
mol	mole
NTP	nucléotides triphosphate
p/CMH	peptide/complexe majeur d'histocompatibilité
p/v	poids/volume
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	tampon phosphate salin

PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PI-PLC	phospholipase C spécifique au phosphatidylinositol
RAG-1/2	gènes d'activation de recombinaison
RE	réticulum endoplasmique
rpm	révolution par minute
S	sérine
scFv	domaines variables sous forme de chaîne unique
scTCR	TCR à chaîne unique
SDS	sulfate de sodium dodécyle
SOB	“soy broth”
s-s	pont disulfure
TAE	tampon d'électrophorèse tris-acétate
TCR	récepteur de cellule T
TTP	thymine triphosphate
U	unité
U.V.	ultra violet
V	variable
v/v	volume/volume

## **Introduction**

Le récepteur des cellules T a été découvert au début des années 1980 et les premières structures obtenues au milieu des années 1990. Cependant, contrairement aux récepteurs des cellules B, les immunoglobulines, qui sont maintenant connus et étudiés de façon exhaustive, la connaissance de la structure du TCR et de ses caractéristiques n'en est encore qu'à ses premiers balbutiements. La difficulté à obtenir le TCR dans une forme soluble et intacte ralentit considérablement les progrès dans ce domaine. Chaque nouveau TCR soluble produit fournit de précieux renseignements. Il permet une meilleure compréhension de la structure même du TCR et de la reconnaissance de ses ligands, les complexes peptide/CMH. Il est évident que la production du TCR 2.102 soluble permettrait à long terme de participer à l'approfondissement de tels sujets. Le TCR 2.102 étant capable d'alloréactivité, il permettrait également l'étude de l'alloréactivité au niveau structural, mais également au niveau de l'affinité et de la cinétique de liaison avec ses différents ligands.

De telles informations aideraient également à mieux définir le modèle d'étude des mécanismes d'alloréactivité lors de rejet de greffe impliquant la cellule T 2.102. Une connaissance plus poussée du modèle raffinerait les informations qui en sont dégagées. Le raffinement de celui-ci passe également par la création d'anticorps clonotypiques au TCR 2.102. Un tel anticorps permettrait de suivre à la trace les cellules T 2.102 dans un modèle physiologique d'alloréactivité lors de rejet de greffe. La production du TCR 2.102 sous une forme soluble pourrait permettre à moyen terme la production de tel anticorps en utilisant le TCR soluble comme immunogène.

L'obtention du TCR 2.102 dans une forme soluble est l'objectif principal du projet de recherche. Différentes approches ont été comparées dans leur succès à produire le TCR 2.102 sous une forme soluble. La renaturation d'un TCR insoluble a été écartée, considérant l'approche trop empirique, ce qui aurait pu s'avérer long et fastidieux. Deux approches principales ont été retenues, la production chez *E. coli* en fusion avec une protéine soluble et l'expression en surface avec un lien clivable chez des cellules de mammifères. Dans tous les cas, le TCR était sous la forme d'une chaîne unique de trois domaines ce qui évite les problèmes de pairage des deux chaînes qui aurait pu être

rencontrés. Suite à la production du TCR 2.102 dans une forme soluble, l'objectif sous-jacent était de vérifier son activité biologique pour s'assurer qu'il était dans la bonne conformation et donc qu'il pouvait reconnaître ses différents ligands. Deux approches ont été utilisées pour sa caractérisation. La capacité du TCR soluble à se fixer sur les ligands a été testée en cytométrie en flux et sa capacité à bloquer l'activation de l'hybridome T 2.102 a été vérifiée avec un test de compétition.

La section qui suit permettra de mieux comprendre ce qu'est une cellule T, comment ce compose le récepteur de ce type de cellules, ce qu'il reconnaît et de quelle façon. De plus, il sera question des différentes méthodes qui ont été utilisées depuis le début de l'étude du TCR pour sa production dans une forme soluble. Ensuite, sera détaillée la méthodologie utilisée au cours du projet, suivi des résultats obtenus dans le cadre de la poursuite des objectifs visés. Un retour sur les résultats et les améliorations à apporter au projet termineront le cœur du document. Celui-ci se conclura par une vue d'ensemble de la réalisation du projet de recherche.

# **1 REVUE DE LA LITTÉRATURE**



## 1.1 LA CELLULE T

### 1.1.1 Le développement de la cellule T

Les cellules T ont pour origine les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ces cellules sont dites pluripotentes puisqu'elles donnent naissance non seulement aux cellules T mais aussi à toutes les cellules circulant dans le sang. Elles ont donc la capacité intrinsèque de se développer en plusieurs types cellulaires. Ces cellules hématopoïétiques peuvent se transformer en progéniteurs myéloïdes pour permettre le développement des granulocytes et des macrophages. Elles peuvent aussi se transformer en progéniteurs lymphoïdes pour permettre le développement des lymphocytes B et T.

Dans le cas de la maturation d'une cellule T, le progéniteur lymphoïde à un stade très immature de la cellule T, va migrer vers un organe lymphoïde central, le thymus. Les cellules migrent en réponse à des peptides chimiotactiques produit par le thymus (Champion *et al.*, 1986). Les progéniteurs peuvent emprunter une voie extrathymique pour leur développement en cellule T (Lake *et al.*, 1991) mais elle est très peu utilisée. C'est donc au thymus (T) que la majorité des lymphocytes deviennent matures, d'où l'appellation « cellule T ».

Le thymus est l'environnement dans lequel la cellule T va proliférer et se différencier en une cellule capable de reconnaître un antigène étranger présenté par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi. Le thymus est un tout petit organe situé au centre de la poitrine, près du cœur. Il est organisé en plusieurs lobes composés du cortex vers l'extérieur et de la médula vers l'intérieur. Plusieurs cellules y entrent mais très peu en sortiront mature (Shortman *et al.*, 1990; Tough et Sprent, 1994), 97% vont y mourir par apoptose (Metcalf et Brumby, 1966; Surh et Sprent, 1994). Les cellules en provenance de la moelle osseuse vont entrer dans la zone cortico-médullaire, migrer dans la région sous-capsulaire du cortex et proliférer activement. A ce stade les thymocytes immatures sont dits double-négatifs puisqu'ils n'expriment aucun des deux co-récepteurs des cellules matures, soit le CD4 et le CD8. De plus, ils n'expriment pas

encore le complexe CD3 : TCR. Une petite portion des thymocytes double-négatifs exprime un TCR soit  $\gamma:\delta$  ou  $\alpha:\beta$  (Shortman, 1992) mais leur rôle n'est pas bien défini.

Les thymocytes double-négatifs qui n'expriment encore aucun TCR vont réarranger les gènes de la chaîne  $\beta$  du TCR qui va ensuite aller s'apparier avec un équivalent de la chaîne  $\alpha$  (pT $\alpha$ ) et être exprimée à la surface de la cellule. Ce pré-TCR est exprimé en association avec le CD3 (Groettrup et von Boehmer, 1993). Son expression en surface va alors permettre l'activation de p56lck, associé à CD3, et d'autres kinases qui activeront à leur tour l'expression des deux co-récepteurs et une prolifération intense (von Boehmer *et al.*, 1999). À ce stade les thymocytes immatures sont dits double-positifs. La présence du pré-TCR va également déclencher le réarrangement de la chaîne  $\alpha$  (Koyasu *et al.*, 1997) et ainsi permettre l'expression d'un TCR fonctionnel et généralement unique à chaque cellule.

Lorsque le TCR  $\alpha:\beta$  est exprimé, les cellules vont subir une première sélection, dite positive. À cette étape, seules les cellules qui reconnaissent les molécules du CMH du soi présenté principalement par les cellules épithéliales du cortex (Anderson *et al.*, 2000) vont poursuivre leur migration vers la jonction cortico-médulaire. La sélection positive, en plus de restreindre les cellules T aux CMH du soi, va amener les cellules double positives à devenir mono positives. C'est généralement à la jonction entre le cortex et la médula que les thymocytes double-positifs vont subir leur deuxième sélection, dite négative. À ce moment, seules les cellules tolérantes aux peptides du soi, présentés principalement par les cellules dendritiques (Anderson *et al.*, 2000), vont survivre. Les cellules vont alors exprimer fortement le TCR et n'exprimer qu'un seul co-récepteur en association avec la restriction au CMH selon les regroupements CMH de classe I : CD8 et CMH de classe II : CD4 (Swain, 1983; von Boehmer *et al.*, 1989). Les thymocytes deviennent des cellules T matures mono-positives.

#### 1.1.1.1 Sélection thymique

La sélection positive et la sélection négative surviennent toutes deux en réaction à la liaison du TCR avec un complexe p/CMH du soi. Comment expliquer qu'un seul type

d'interaction puisse mener à la survie (sélection positive) ou à la mort (sélection négative) de la cellule? Plusieurs modèles ont été élaborés au cours des années mais celui qui a réussi à s'accorder avec la majorité des résultats expérimentaux obtenus au fil du temps est celui de l'affinité. Une forte liaison du TCR avec un ligand induirait l'apoptose alors qu'une faible liaison induirait un signal de survie à la cellule (Sebzda *et al.*, 1999). Plusieurs expériences ont été effectuées pour tenter de comprendre comment une force de liaison peut se transposer sur le destin de la cellule. La clé réside probablement dans la compréhension des premiers événements de signalisation suite à la liaison du TCR avec un ligand. Il a été démontré que les motifs d'activation de récepteurs immunologiques dépendant de la tyrosine (ITAMs) retrouvés sur les chaînes CD3 amplifiaient le signal du TCR durant le développement thymique (Love et Shores, 2000; Shores et Love, 1997; van Oers *et al.*, 1998) mais aucune démonstration n'a réussi à prouver leur rôle dans la sélection positive ou négative (Hogquist, 2001). L'activation des kinases régulatrices du signal extracellulaire (ERK) a été identifiée comme pouvant être un point important de différenciation dans la signalisation lors de la sélection positive ou négative (Alberola-Ila *et al.*, 1996; Sharp *et al.*, 1997; Sugawara *et al.*, 1998). Une équipe a rapporté qu'un ligand d'une forte affinité stimulait une activation forte et transitoire de ERK alors qu'un ligand de faible affinité stimulait une plus faible activation mais que celle-ci était soutenue (Werlen *et al.*, 2000). Son implication dans la sélection négative reste par contre encore à déterminer. Les mécanismes par lesquels la cellule va survivre ou entrer en apoptose lors de la sélection thymique demeurent encore ambigus.

#### 1.1.1.2 Orientation dans la lignée CD4 ou CD8

Le cheminement et les facteurs influençant l'orientation d'une cellule dans une lignée CD4 ou CD8 est l'objet de plusieurs discussions. Dernièrement l'implication de la  $p56^{lck}$  au niveau de la signalisation lors de l'orientation du type de lignée a fait l'objet de plusieurs travaux (Berg et Kang, 2001). Le modèle qui en ressort propose qu'une forte activation de la  $p56^{lck}$  mènerait vers une orientation CD4 (constitutivement associé à de hauts niveaux d'activité de  $p56^{lck}$ ) alors qu'une faible activation dirigerait plutôt vers une lignée CD8 (constitutivement associé à de très bas niveaux d'activité de  $p56^{lck}$ ) (Turner *et al.*, 1990). D'autres facteurs semblent également jouer un rôle dans l'orientation de la

lignée comme la protéine Notch ou ERK (Berg et Kang, 2001) et même l'affinité et la densité du ligand du TCR (Goldrath *et al.*, 1997; Sebzda *et al.*, 1997). Il a également été démontré (Chan *et al.*, 1993; Crump *et al.*, 1993; van Meerwijk et Germain, 1993) qu'il existait des cellules avec des niveaux intermédiaires d'expression des co-récepteurs. L'orientation dans une lignée CD4 ou CD8 peut donc prendre plusieurs voies et être influencé par différents facteurs.

### 1.1.2 Le rôle de la cellule T

Les cellules résultantes du processus de maturation sont des cellules restreintes au CMH et tolérante au soi qui sont soit CD4+ ou CD8+. Ces cellules non-activées, naïves, émigrent alors vers la périphérie où elles pourront jouer leurs rôles dans la défense de l'hôte.

La cellule T est impliquée dans l'immunité adaptative. Contrairement aux cellules de l'immunité innée, les cellules T n'interviennent pas immédiatement dans la réponse. Elles doivent d'abord entrer en contact avec une autre cellule, cellule présentatrice d'antigène professionnelle (CPA), qui va lui présenter un peptide étranger. En plus, un signal de co-stimulation, impliquant entre autres les molécules B7 liant CD28 sur la cellule T, doit être présent pour induire la production d'un facteur de croissance, l'interleukine-2 (IL-2). Ce contact va activer la cellule qui réagit spécifiquement avec le peptide et engendrer une expansion clonale de celle-ci. La réponse est donc spécifique, contrairement aux cellules de l'immunité innée. Une fois activée, la cellule naïve devient une cellule effectrice.

Les cellules T effectrices sont impliquées dans deux types de réponse immune, soit celle à médiation cellulaire ou humorale. La réponse à médiation cellulaire est réalisée par les cellules T CD8 cytotoxiques et les cellules T CD4 inflammatoires. Les cellules T CD8 cytotoxiques reconnaissent les complexes peptides : CMH de classe I et vont excréter des protéines cytotoxiques comme la perforine 1 et les granzymes qui vont induire l'apoptose chez les cellules infectées. La cellule peut également induire la mort

par liaison de molécules membranaires comme Fas/FasL ou encore agir en sécrétant des cytokines comme l'IFN- $\gamma$ . Les cellules T CD8 cytotoxiques tuent directement les cellules dont le cytosol est infecté soit par un virus ou un parasite ainsi que certaines cellules tumorales. Les cellules T CD4 inflammatoires pour leur part reconnaissent les complexes peptides : CMH de classe II présentés par les macrophages et vont activer ceux-ci principalement par sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Une multitude de cytokines va aussi être libérée afin de coordonner l'ensemble de la réponse nécessaire contre les pathogènes intracellulaires comme la destruction de certains macrophages, la différenciation de ceux-ci dans la moelle osseuse ou encore favoriser leur accumulation au site de l'infection en stimulant la diapédèse et la chimiotaxie. Les cellules T CD4 inflammatoires activent les macrophages dont les vésicules intracellulaires sont infectées par des bactéries ou des parasites.

Ce sont les cellules T CD4 auxiliaires qui sont impliquées dans la réponse humorale. Ces cellules reconnaissent les complexes peptides : CMH de classe II présenté par les cellules B où le peptide reconnu par les deux cellules provient du même antigène. La cellule T va alors synthétiser des molécules membranaires comme le ligand du CD40, ainsi que des cytokines comme l'IL-4, qui vont activer les cellules B afin que celles-ci prolifèrent et se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

## 1.2 LE TCR

### 1.2.1 Découverte du TCR

C'est en 1982 que la découverte de l'existence d'un récepteur spécifique aux cellules T a été faite (Allison *et al.*, 1982). Lors de la création d'une banque d'hybridomes de cellule B, un de ceux-ci, le 124-40, sécrétait un anticorps qui ne réagissait qu'avec les cellules qui avaient été utilisées pour l'immunisation (ils avaient immunisé une souris BALB/C avec des lymphomes, C6XL, provenant d'une souris traitée aux rayons X). Ils étaient très étonnés de la présence d'un antigène spécifique à la surface d'un lymphome T. C'était la première fois que cela était rapporté. Ils ont voulu

déterminer la provenance de cet antigène. En réalisant des tests d'immunoprécipitation suivit d'électrophorèse en deux dimensions, ils ont déterminé qu'il s'agissait d'une glycoprotéine ayant des sous-unités de 39000 et 41000 de poids moléculaire liées par un pont disulfure. En comparant avec des extraits de différents types cellulaires, ils ont observé que cette protéine était présente sur tous les types de cellules T (cellules T normales, thymocytes, lymphomes autre que C6XL) mais pas sur les cellules B, ni sur les cellules de la moelle osseuse. Ces résultats suggéraient donc que l'épitope contre lequel réagissait l'anticorps 124-40 se retrouvait sur une protéine normalement présente sur les cellules T. Ils ont émis deux hypothèses pouvant expliquer leur découverte. La première étant que l'antigène reconnu par l'anticorps 124-40 était muté et la deuxième était que l'antigène possédait une région variable, celle reconnue par l'anticorps, et une région constante comme pour les immunoglobulines. La deuxième hypothèse a été confirmée peu de temps après en utilisant des anticorps clonotypiques (Haskins *et al.*, 1983; Kaye *et al.*, 1983; Meuer *et al.*, 1983; Samelson et Schwartz, 1983).

### 1.2.2 Les gènes du TCR $\alpha$ : $\beta$

En utilisant des techniques de génétique moléculaire, de la comparaison de l'ARNm d'une cellule T à celui d'une cellule B jusqu'aux analyses de séquences d'ADN génomique, les gènes menant à l'expression des récepteurs de cellule T ont pu être identifiés et localisés.

Le complexe des gènes du TCR est divisé en trois loci. Le locus TCR $\alpha$ / $\delta$  est situé sur le chromosome 14 chez l'humain comme chez la souris. Le locus TCR $\beta$  se retrouve sur le chromosome 7 chez l'humain et 6 chez la souris alors que le locus TCR $\gamma$  se retrouve également sur le chromosome 7 chez l'humain mais sur le chromosome 13 chez la souris. Les loci couvrent de grandes distances sur les chromosomes allant de 200 Kb pour le locus TCR $\gamma$  jusqu'à 1 Mb pour le locus TCR $\alpha$ / $\delta$ . Les loci du TCR contiennent d'autres gènes que ceux directement impliqués dans l'expression d'un récepteur de cellule T et également des pseudogènes (Rowen *et al.*, 1996). Les gènes spécifiques au TCR représentent 0.1% du génome (Glusman *et al.*, 2001).

Il y a plusieurs exons codant pour chacun des segments des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  mais seul un réarrangement productif contenant un seul exon pour chaque type de segment est conservé (**Figure 1**). Le locus contenant les gènes pour la chaîne  $\beta$  commence par une série de 52 segments variables ( $V$ ) chacun étant précédé d'un segment codant pour le peptide signal ( $L$ -leader). Les segments de diversité ( $D$ ), de jonction ( $J$ ) et constants ( $C$ ) suivent d'une certaine distance la série de segments  $V$ . Cette région est composée de deux groupes contenant chacun les trois types de segments. Il y a un seul segment  $D$  et  $C$  pour chacun des groupes et respectivement 6 et 7 segments  $J$  (Davis, 1985; Kronenberg *et al.*, 1986). Le réarrangement des segments pour créer un seul exon complet et productif débute avec le réarrangement des segments  $D$  et  $J$  suivi du réarrangement de  $V$  et  $DJ$  (Benoist et Mathis, 1992). Les gènes codant pour le domaine variable ( $V$ -comprenant les segments  $VDJ$ ) vont ensuite être transcrits avec le domaine constant ( $C$ ) et les deux domaines joints ensemble par épissage pour finalement être traduits. Le réarrangement doit donner une chaîne  $\beta$  capable de se lier à la protéine pT $\alpha$  afin d'être exprimée à la surface de la cellule et activer celle-ci. Si le réarrangement n'est pas productif, s'il ne conduit pas à une activation cellulaire, une deuxième série de réarrangement va avoir lieu du fait qu'il existe deux groupes des segments  $D$  et  $J$ . Un seul locus (le génome existant sous forme de paires de chromosomes) à la fois est réarrangé ou alors ils le sont de façon séquentielle. Le réarrangement entre les différents segments n'est pas totalement aléatoire, certains segments sont utilisés plus fréquemment (Candeias *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1991). L'acétylation des histones pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la recombinaison des segments (McMurry et Krangel, 2000).

Le réarrangement entre les segments est possible grâce à la présence de séquences signal de recombinaison (RSS) flanquant les différents segments (Akira *et al.*, 1987; Yancopoulos et Alt, 1986). Les séquences signal de recombinaison sont des séquences composées d'une première série de 7 nucléotides conservés (heptamère) espacée de 12 ou 23 nucléotides d'une deuxième série de 9 nucléotides conservés (nonamère) (Zhu et Roth, 1996). La recombinaison implique plusieurs protéines dont les protéines codées par les gènes d'activation de recombinaison (RAG-1, RAG-2). Le processus de recombinaison

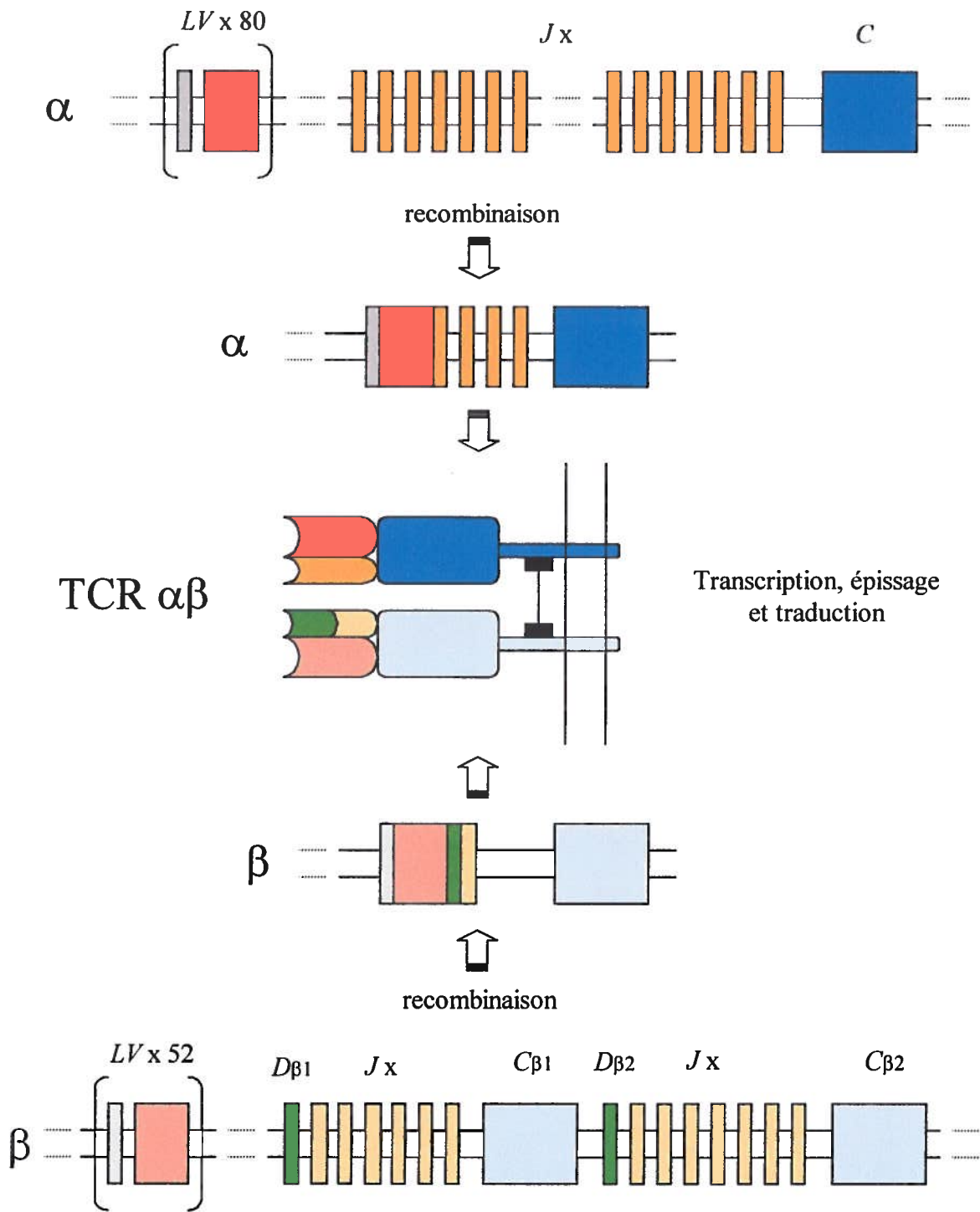


Figure 1. Structure des gènes. Adapté de (Janeway, 1997)



n'est pas précis. Les brins d'ADN sont clivés mais des nucléotides peuvent être ajoutés avant que les brins ne soit ligués de nouveau. L'ajout peut se faire à deux moments. Lorsque le double brin d'ADN est coupé, les extrémités formeraient des structures en épingle à cheveux. C'est à ce moment que le premier ajout de nucléotides se fait. Le dernier nucléotide complémentaire se lie à son homologue du brin sens et deviendra, suite au clivage du brin complémentaire, un nucléotide du brin sens ainsi que tous ceux qui le précédaient jusqu'à la cassure. Ces nucléotides sont appelés P puisqu'ils sont palindromiques. Ils ne sont pas réellement ajoutés mais plutôt générés à partir du brin complémentaire. Le deuxième ajout de nucléotides suit immédiatement celui des nucléotides P. Des nucléotides sont ajoutés au hasard à l'ADN simple-brin par la transférase de déoxynucléotides terminaux (TdT). Ces nucléotides sont appelés N puisqu'ils sont ajoutés *de novo*.

Le locus de la chaîne  $\alpha$  ressemble à celui de la chaîne  $\beta$ . Il débute avec les segments  $V$  mais il en contient beaucoup plus, jusqu'à 80. Dans la chaîne  $\alpha$  il n'y a pas de segment  $D$ . Le locus est plutôt composé de deux groupes de segments  $J$  comptant au total 61 segments (Davis, 1988). La région se termine avec un seul segment  $C$ . Le réarrangement se fait de la même façon que pour la chaîne  $\beta$  à l'exception que les segments  $J$  sont tout de suite réarrangés avec les segments  $V$  puisqu'il n'y a pas de segment  $D$ . De plus, le réarrangement ne se ferait pas de façon aléatoire mais débiterait plutôt avec les segments situés au centre du locus et continuerait vers l'extérieur jusqu'à l'obtention d'un réarrangement productif (Roth *et al.*, 1991). Plusieurs réarrangement sont donc possible. Il y a aussi ajout de nucléotides P et N dans la chaîne  $\alpha$ .

Le grand nombre des différents segments pour chacune des chaînes offre la possibilité de créer une grande variété de combinaison. De plus, l'ajout de nucléotides P et N entre les segments codant pour le domaine variable augmente encore plus la diversité du répertoire des TCR. Étant donné que le TCR ne subit pas de maturation d'affinité une fois exprimé, cette diversité est essentielle afin que les différents TCR puissent être en mesure de reconnaître l'infinité de peptides étrangers qui peuvent leurs être présentés.

### 1.2.2.1 Plusieurs chaînes mais un seul TCR

Un seul TCR fonctionnel est habituellement exprimé à la surface des cellules même si chaque chromosome peut entraîner la production d'une chaîne. Cette propriété peut s'expliquer par un mécanisme d'exclusion allélique. Le terme d'allèle est utilisé puisque chaque locus produit une protéine différente et non parce que les gènes diffèrent. Lorsqu'une chaîne  $\beta$  fonctionnelle est produite et exprimée en association avec  $pT\alpha$ , il y a arrêt du réarrangement au locus. Le pré-TCR joue un rôle essentiel dans le mécanisme d'exclusion allélique (von Boehmer *et al.*, 1999). Puisque les deux locus ne sont pas réarrangés simultanément, une seule chaîne  $\beta$  est produite et exprimée, c'est l'exclusion allélique génique (Malissen *et al.*, 1992). L'arrêt du réarrangement de la chaîne  $\alpha$  ne se fait pas au moment où celle-ci est exprimée à la surface mais plutôt au moment où l'expression de RAG-1 et RAG-2 est régulée à la baisse. Cette régulation coïnciderait avec un signal de sélection positive (Borgulya *et al.*, 1992). Ce délai permettrait à la cellule d'essayer plusieurs chaînes  $\alpha$ , des deux allèles, et ainsi augmenter ses chances d'être sélectionnée (Benoist et Mathis, 1992). Dans la population des cellules T matures, environ 25% possèdent deux chaînes  $\alpha$  dans leur cytoplasme (Corthay *et al.*, 2001). Une seule chaîne  $\alpha$  est par contre habituellement exprimée à la surface de la cellule même si plusieurs sont produites, c'est l'exclusion allélique phénotypique (Malissen *et al.*, 1992). Par contre cette exclusion ne fonctionne pas à 100%, une équipe a estimé à environ 8% le nombre de cellules T périphériques qui expriment à la surface deux chaînes  $\alpha$  (Corthay *et al.*, 2001). Ces cellules suscitent beaucoup d'intérêt dans la recherche pour leurs rôles potentiels dans différentes maladies, particulièrement dans les maladies autoimmunitaires.

### 1.2.3 La structure du TCR $\alpha$ : $\beta$

Les gènes du TCR une fois réarrangés et exprimés, donnent deux glycoprotéines transmembranaires. C'est d'abord avec l'étude de l'ADNc, en déduisant la composition en acides aminés des deux chaînes, que la structure du TCR a été évaluée en comparant sa composition avec celle des immunoglobulines. Ensuite c'est la production de TCR soluble cristallographié qui a permis de confirmer la structure réelle du TCR.

La partie extramembranaire de chaque chaîne du TCR est constituée d'un domaine variable et d'un domaine constant, un peu comme les immunoglobulines. Chaque domaine contient un pont disulfure. Plusieurs glucides, jusqu'à sept, sont fixés aux domaines par N-glycosylation (Garcia *et al.*, 1999). La partie extramembranaire est reliée à la partie transmembranaire à l'aide d'une région charnière. Cette dernière possède une cystéine qui permet la formation d'un pont disulfure entre les deux chaînes. C'est ce lien qui maintient les deux chaînes ensemble. La région transmembranaire est pour sa part une hélice hydrophobe qui contient des résidus chargés positivement (résidus basiques), deux dans la chaîne  $\alpha$  et un seul dans la chaîne  $\beta$ . Ces charges, inhabituelles dans un domaine transmembranaire, aurait tendance à déstabiliser les chaînes mais elles ont plutôt la particularité de favoriser l'interaction avec d'autres chaînes essentielles à la fonction du récepteur. Finalement une très courte queue cytoplasmique termine la structure.

#### 1.2.3.1 Association avec d'autres protéines

Les queues cytoplasmiques des deux chaînes formant le TCR sont trop petites pour induire le signal de reconnaissance d'un ligand. Le TCR doit donc être étroitement lié avec d'autres protéines capables d'induire un tel signal. Les protéines impliquées font partie du complexe CD3. Six chaînes supplémentaires s'associent avec le TCR afin de stabiliser et de permettre une signalisation adéquate (**Figure 2**). Quatre chaînes ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\gamma$ ) constitués d'un domaine extramembranaire, d'une région transmembranaire contenant un résidu chargé négativement (résidu acide) et d'un domaine cytoplasmique, s'associent sous la forme d'un hétérodimère de chaque côté du TCR. Le résidu acide va former un pont salin avec les résidus basiques des chaînes du TCR et ainsi stabiliser la molécule. Chacune de ces chaînes possède également dans le domaine cytoplasmique des ITAMs. Les motifs ITAMs sont des sites de phosphorylation pour des tyrosines kinases de la famille Src qui sont impliquées dans les premières étapes de la cascade de signalisation du TCR. Un troisième dimère, habituellement sous forme d'un homodimère de la chaîne  $\zeta$  mais aussi quelque fois associé à  $\gamma$  de Fc $\epsilon$  chez l'Homme ou à  $\eta$  chez la souris, est aussi associé au TCR. Contrairement aux autres chaînes, celles-ci n'ont pas de domaine extramembranaire, elles sont reliées ensemble par un pont disulfure et possèdent un



domaine cytoplasmique. Ce domaine contient également des motifs ITAMs, en l'occurrence trois.

### **1.3 RECONNAISSANCE DU LIGAND**

#### **1.3.1 Ligands du TCR**

Le TCR reconnaît des fragments peptidiques qui sont présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, le CMH. Les complexes peuvent être du soi ou du non-soi. Les CMH du soi sont impliqués dans la réponse immunitaire classique alors que les CMH du non-soi, étrangers, sont impliqués dans l'alloréactivité, observée lors de transplantation d'organe ou de tissu. Jusqu'à 10 % des cellules T périphériques sont capables d'alloréactivité (Kranz, 2000). Ces cellules T sont stimulées par des complexes peptides/CMH où le CMH est allogénique et vont induire la destruction des ces cellules étrangères, d'où le rejet de la greffe. Le TCR est également reconnu de manière non spécifique par les superantigènes. Les superantigènes vont se fixer directement sur la région V $\beta$  du TCR, plus spécifiquement la région codée par le segment V $\beta$ , ainsi que sur les différents segments des domaines variables d'un complexe pCMH (Davis, 1988). Un superantigène peut activer de 5 à 20 % de l'ensemble des cellules T (Kotb, 1995). Ce type de stimulation ne fait cependant pas partie d'une réponse immunitaire puisqu'elle ne conduit pas à une immunité adaptative mais fait plutôt partie du mécanisme de pathogénicité microbienne. Les entérotoxines staphylococciques (SE) en sont un exemple et provoquent un empoisonnement alimentaire.

Le rôle du CMH comme ligand du TCR a été confirmé il y a environ 15 ans (Bjorkman *et al.*, 1987) alors que sa découverte chez la souris remonte à 1937 (Gorer, 1937). Il existe trois types de CMH, des CMH de classe I et de classe II dit classique ainsi que des CMH non-classique. La majorité des TCR reconnaît les CMH classiques mais certains sont restreints à CD1, CMH non-classique. Chez l'humain, on les nomme HLA pour « Human Leucocytes Antigens » et le complexe de gènes se trouve sur le

chromosome 6. Chez la souris, le complexe se nomme H-2 et est présent sur le chromosome 17.

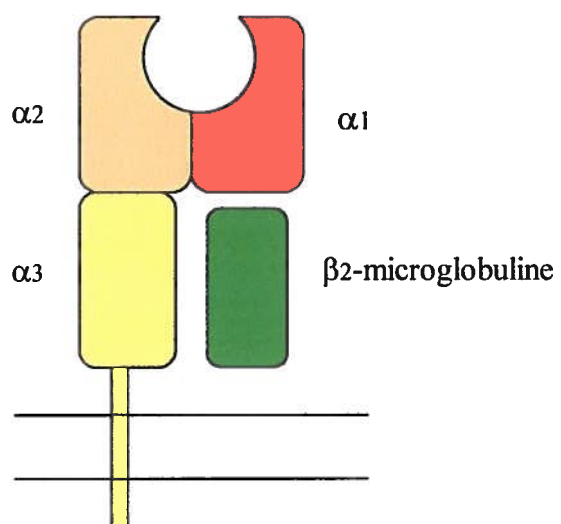
Les HLA de classe I se retrouvent sous trois formes, HLA-A, B ou C. L'équivalent chez la souris sont les gènes H2-K, D et L. Se sont des glycoprotéines retrouvées à la surface de la majorité des cellules nucléées, que se soit les cellules nucléées des tissus lymphoïdes ou des organes comme le foie, les reins, le cerveau. Les CMH de classe I sont constitués d'une chaîne  $\alpha$  composée de trois régions, encrée dans la membrane ainsi que de la  $\beta_2$ -microglobuline, associée à la chaîne  $\alpha$  de manière non-covalente (**Figure 3**). Le gène de cette dernière n'est pas situé dans le complexe HLA.

Le sillon où se loge le peptide, sillon peptidique, est formé des régions  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  où une hélice  $\alpha$  de chacune des régions borde le sillon en se rapprochant aux extrémités. Des feuilletts  $\beta$ , de chacune des régions, forment le plancher du sillon (Bjorkman *et al.*, 1987). Un peptide d'une longueur de 8 à 10 acides aminés se fixe sur la longueur par des résidus d'ancrage, majoritairement situés aux extrémités, à des poches dans le sillon. Les peptides sont retenus par des ponts hydrogènes réalisés entre les chaînes latérales des a.a. du peptide et de ceux formant les poches du sillon. Les extrémités du peptide sont solidement encrées à l'intérieur du CMH. Le peptide a également la particularité de former une arche surélevée au centre.

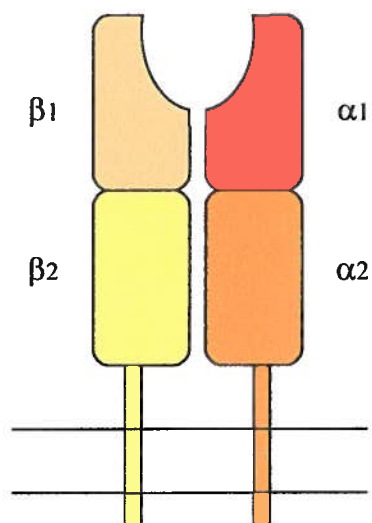
Les peptides retrouvés sur les CMH de classe I proviennent de protéines synthétisées de façon endogène dans le cytosol de la cellule et dégradées par un complexe protéolytique, le protéasome. Ces fragments sont alors amenés dans le réticulum endoplasmique (RE) par une composante du système de transport, TAP. Les CMH de classe I sont synthétisés dans le RE et y demeurent jusqu'à ce qu'un peptide se fixe dans le sillon de manière à stabiliser le complexe. Le complexe peptide/CMH est alors transporté à la surface de la cellule par l'appareil de Golgi (Thorsby, 1999).

Les HLA de classe II se retrouvent aussi sous trois formes, HLA-DP, DQ et DR. L'équivalent chez la souris sont les gènes H2 I-A et I-E. Les CMH de classe II se

## CMH classe I



## CMH classe II



**Figure 3. Schéma des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II.**

retrouvent à la surface de cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes, soit les CPA (cellules présentatrice d'antigènes). Les CPA regroupent les cellules B, les macrophages, les cellules dendritiques et les monocytes. Les CMH de classe II sont constitués de deux chaînes ancrées dans la membrane, une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$ , composée chacune de deux régions. Les deux chaînes sont associées ensemble par un lien non-covalent (**Figure 3**). Le sillon peptidique est semblable au sillon des CMH de classe I à l'exception qu'il est formé des régions  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  et que les extrémités sont ouvertes (Stern et Wiley, 1994). Le peptide est d'une longueur variant de 10 à 25 acides aminés et adopte une conformation semblable à une hélice de polyproline de type-II (Stern et Wiley, 1994). Le peptide est fixé par des résidus d'ancrage retrouvés à des distances variables des extrémités laissant celles-ci libres. De plus, le peptide est plus profondément ancré dans le sillon peptidique, comparativement au CMH de classe I, et les interactions ne se font pas uniquement avec les chaînes latérales mais aussi avec les atomes du squelette du peptide.

Les peptides retrouvés sur les CMH de classe II proviennent de protéines de pathogènes synthétisées dans des vésicules intracellulaires ou encore de protéines exogènes. Les vésicules infectées ou formées suite à l'endocytose des protéines exogènes vont s'acidifier ce qui va activer des protéases qui vont dégrader les protéines en peptides. Les CMH de classe II sont aussi synthétisés dans le RE comme les CMH de classe I mais grâce à une protéine qui les stabilise, la chaîne invariante (Ii), ils amorcent leur transport vers la surface cellulaire sans avoir fixé de peptide. Ce n'est que lorsque la vésicule contenant le CMH fusionne avec une vésicule acide contenant des peptides que la fixation d'un peptide est possible. Suite à la fusion, la chaîne invariante est clivée, ne laissant qu'un petit fragment, CLIP, dans le sillon peptidique. C'est la molécule HLA-DM, présente dans la même vésicule que le CMH, qui catalyse le transfert de CLIP pour un peptide. Le complexe peptide/CMH peut alors être transporté à la surface de la cellule (Thorsby, 1999).

Comme une molécule de CMH ne lie pas le peptide par tous ses acides aminés, plusieurs peptides peuvent avoir un ou des résidus d'ancrage nécessaire à sa liaison. Une



molécule lie donc un groupe de peptides possédant des résidus d'ancrage de même nature. Il n'est pas nécessaire que ce soit le même a.a. mais il doit posséder des caractéristiques similaires (Thorsby, 1999).

#### 1.3.1.1 Grande variabilité des molécules du CMH

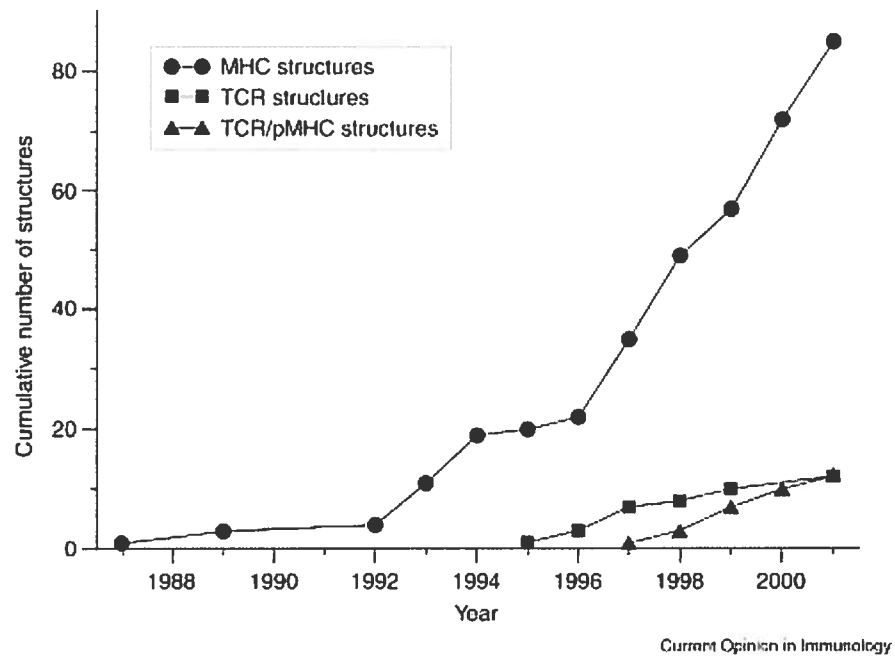
Les CMH varient sous deux différents aspects, ils sont à la fois polygéniques et polymorphiques. Ils sont polygéniques puisqu'ils sont codés par plusieurs gènes (il existe plusieurs CMH de classe I (A, B et C) et de classe II (DP, DQ et DR)). De plus, la molécule DR possède deux loci de la chaîne  $\beta$ . Les gènes du CMH sont également polymorphiques puisqu'il existe plusieurs allèles pour chacun de ces gènes, certains loci comptent des centaines d'allèles (Bodmer *et al.*, 1997).

Les gènes du CMH sont d'ailleurs les plus polymorphes connus. Il n'y a que la chaîne DR $\alpha$  qui n'a pas de variant, elle est monomorphe. Comme chaque individu possède deux allèles pour chacun des locus, pour lequel il est souvent hétérozygote, le polygénisme combiné au polymorphisme permet l'expression de six différentes molécules de CMH de classe I et de huit molécules de classe II (parfois plus).

Le polymorphisme est principalement localisé au sillon peptidique (Rammensee *et al.*, 1995). Les points les plus variables sont situés aux endroits les plus exposés du sillon c'est-à-dire les endroits qui entrent en contact avec le peptide ou le TCR. La variabilité des différents CMH se fait particulièrement sentir dans les poches qui accueillent les chaînes latérales des a.a. des peptides. Les différentes tailles, formes et charges que peuvent prendre ces poches vont influencer quel type d'acides aminés elles peuvent accueillir et donc quel profil de peptide le CMH peut lier.

#### 1.3.2 Interaction TCR /pCMH

Les premières structures cristalographiées de complexe TCR/pCMH sont apparues en 1996 (Garboczi *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1996). Il existe depuis uniquement 11 structures de ces complexes qui représentent seulement 6 TCR différents. Il n'y a pas eu

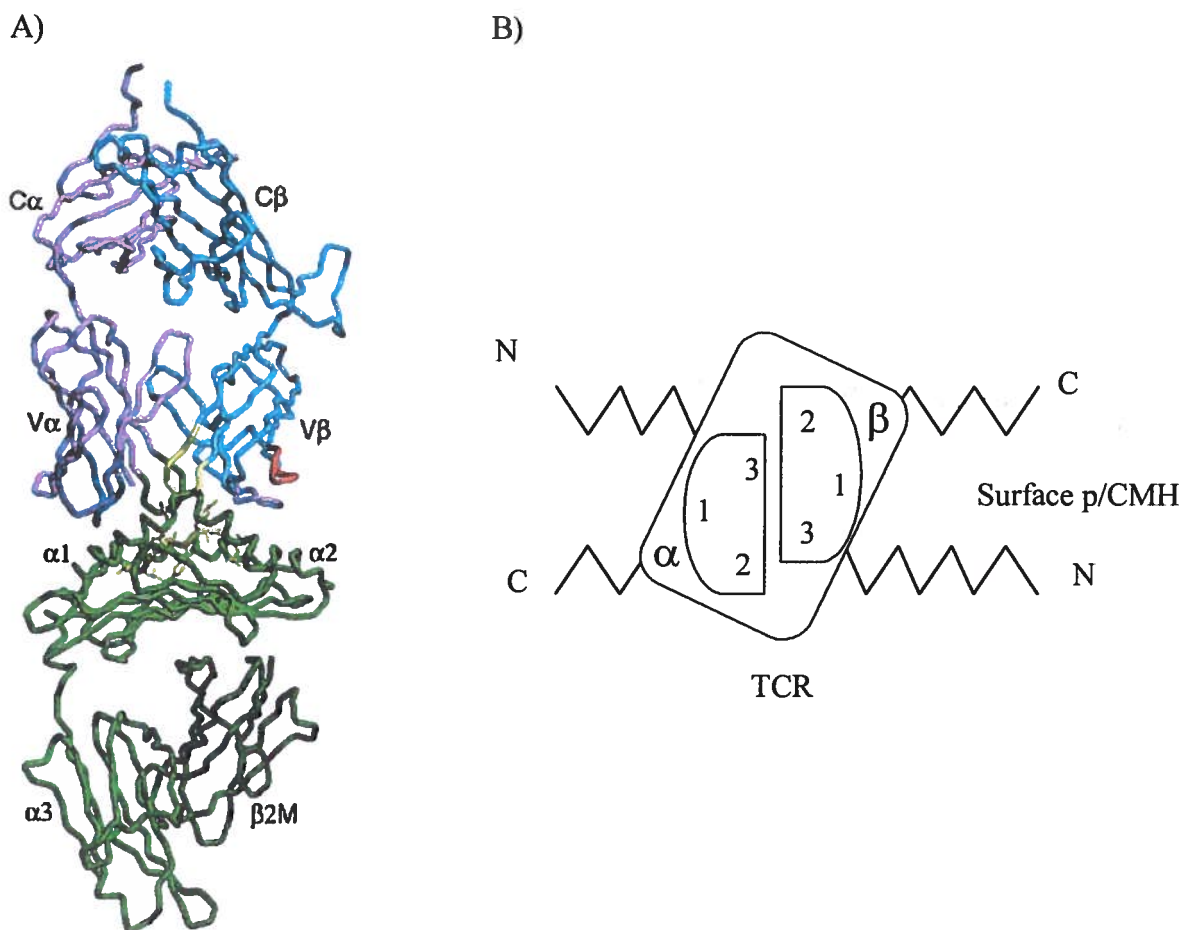


**Figure 4. Nombre cumulatif de structure de CMH, de TCR et de complexes TCR/pCMH cristallographiés au cours des années. (Rudolph et Wilson, 2002)**

d'augmentation spectaculaire comme ce fut le cas après les premières cristallographies de complexes peptide/CMH (Rudolph et Wilson, 2002) (**Figure 4**). Cette réalité démontre bien la difficulté à produire le TCR sous une forme soluble et en quantité suffisante.

Le TCR entre en contact, en général, avec le complexe peptide/CMH dans une orientation diagonale. Il existe par contre une légère différence entre une interaction avec un CMH de classe I ou de classe II (Rudolph et Wilson, 2002). Un complexe fait cependant exception en ayant été récemment décrit avec une orientation orthogonale (Reinherz *et al.*, 1999). De plus, l'orientation s'inscrit dans le sens où le domaine  $V\alpha$  est toujours plus près de l'extrémité N-terminal du peptide et le domaine  $V\beta$  de l'extrémité C-terminale (Hennecke et Wiley, 2001). En plus de tourner (twist) par rapport au plan du CMH, le TCR s'incline (tilt) et bascule (roll) par rapport à ce dernier. Le TCR présente donc une déviation dans les trois plans lorsqu'il se lie à un complexe peptide/CMH (**Figure 5a**). Cette déviation peut s'expliquer par l'inclinaison des domaines variables du CMH qui constituent la niche peptidique (Ding *et al.*, 1998; Teng *et al.*, 1998). Elle peut également être influencée par l'inclinaison des domaines variables du TCR lui-même (Rudolph et Wilson, 2002).

Les régions du TCR ne sont pas toutes impliquées au même niveau dans la reconnaissance du pCMH (**Figure 5b**). Le domaine variable de chaque chaîne est constitué de trois régions plus importantes dans la reconnaissance soit les CDR1, 2 et 3 (régions déterminant la complémentarité). Les CDR3 sont situés au centre du site de reconnaissance et sont les régions les plus variables puisqu'elles sont composées de la jonction des segments  $VJ$  pour la chaîne  $\alpha$  et  $VDJ$  pour la chaîne  $\beta$ . Les CDR2 sont les plus à l'extérieur du site de reconnaissance alors que les CDR1 sont entre ceux-ci et les CDR3 (Reinherz *et al.*, 1999). Le CDR1 et le CRD2 sont codés à même le génome et se retrouvent dans la région variable des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR. Lorsque les différents complexes cristallographiés sont comparés, on remarque que le CDR3 de la chaîne  $\beta$  entre en contact avec le complexe pCMH beaucoup plus souvent que les CDR1 et 2 de la même chaîne. Dans le cas de la chaîne  $\alpha$ , c'est le CDR2 qui n'a presque pas de contact



**Figure 5. Complexe TCR/pCMH.** A) Structure en trois dimensions du complexe 2C-K<sup>b</sup>-SIYR. Le TCR est au dessus, chaîne  $\alpha$  en rose et chaîne  $\beta$  en bleu pâle alors que le CMH est en dessous en vert avec la  $\beta_2$ -microglobuline en vert foncé. Le peptide est en jaune. Les boucles CDR du TCR sont aussi identifiées; 1 $\alpha$  en bleu, 2 $\alpha$  en violet, 3 $\alpha$  en vert, 1 $\beta$  en bleu pâle, 2 $\beta$  en rose, 3 $\beta$  en jaune (Degano *et al.*, 2000). B) Orientation du TCR et emplacement des CDR lors de la reconnaissance du complexe p/CMH (adapté de (Hennecke et Wiley, 2001)).

avec le pCMH. De façon générale, c'est la boucle CDR3 qui est la plus impliquée dans les contacts avec le pCMH (Rudolph et Wilson, 2002). De plus, c'est cette même boucle qui entre le plus souvent en contact avec le peptide. La relation entre la boucle CDR3 et le peptide était prévisible puisque le peptide est l'élément le plus diversifié dans le complexe et que la boucle CDR3 représente l'endroit le plus variable du TCR. La boucle CDR1 entre aussi en contact avec le peptide mais également avec le CMH, tout comme CDR3. Il n'y a que CDR2 qui n'entre pas en contact avec le peptide (Hennecke et Wiley, 2001).

De plus, ce n'est pas tout le peptide qui entre en contact avec le TCR. Habituellement seulement 2 à 5 chaînes latérales vont être impliquées dans un contact direct avec le TCR. Dans le cas du CMH de classe I c'est évidemment les résidus débordant du sillon qui vont être les plus impliqués. Ces résidus représentent les points chauds fonctionnels de l'interface TCR/pCMH, particulièrement les positions P4, P6 et P7 dans un peptide de 8 acides aminés. Pour le CMH de classe II, les chaînes latérales impliquées sont plus dispersées le long du peptide et représentent les positions P-1, P2, P3, P5 et P8 (Rudolph et Wilson, 2002).

Un TCR n'est pas spécifique à un seul complexe peptide/CMH. Cette particularité est essentielle afin que les lymphocytes T puissent réagir dans un délai rapide à la multitude de peptides qui leur sont présentés. Ce sont plutôt les signaux engendrés par la liaison à différents complexes peptide/CMH qui vont définir le type de réponse de la cellule T. Par exemple, une substitution d'une arginine pour une lysine dans le peptide dEV8 lors de la reconnaissance de H-2K<sup>b</sup> par le TCR 2C n'a pas eu d'effet notable sur la structure du complexe mais a eu des conséquences spectaculaires sur la cytotoxicité de la réponse cellulaire (Degano *et al.*, 2000).

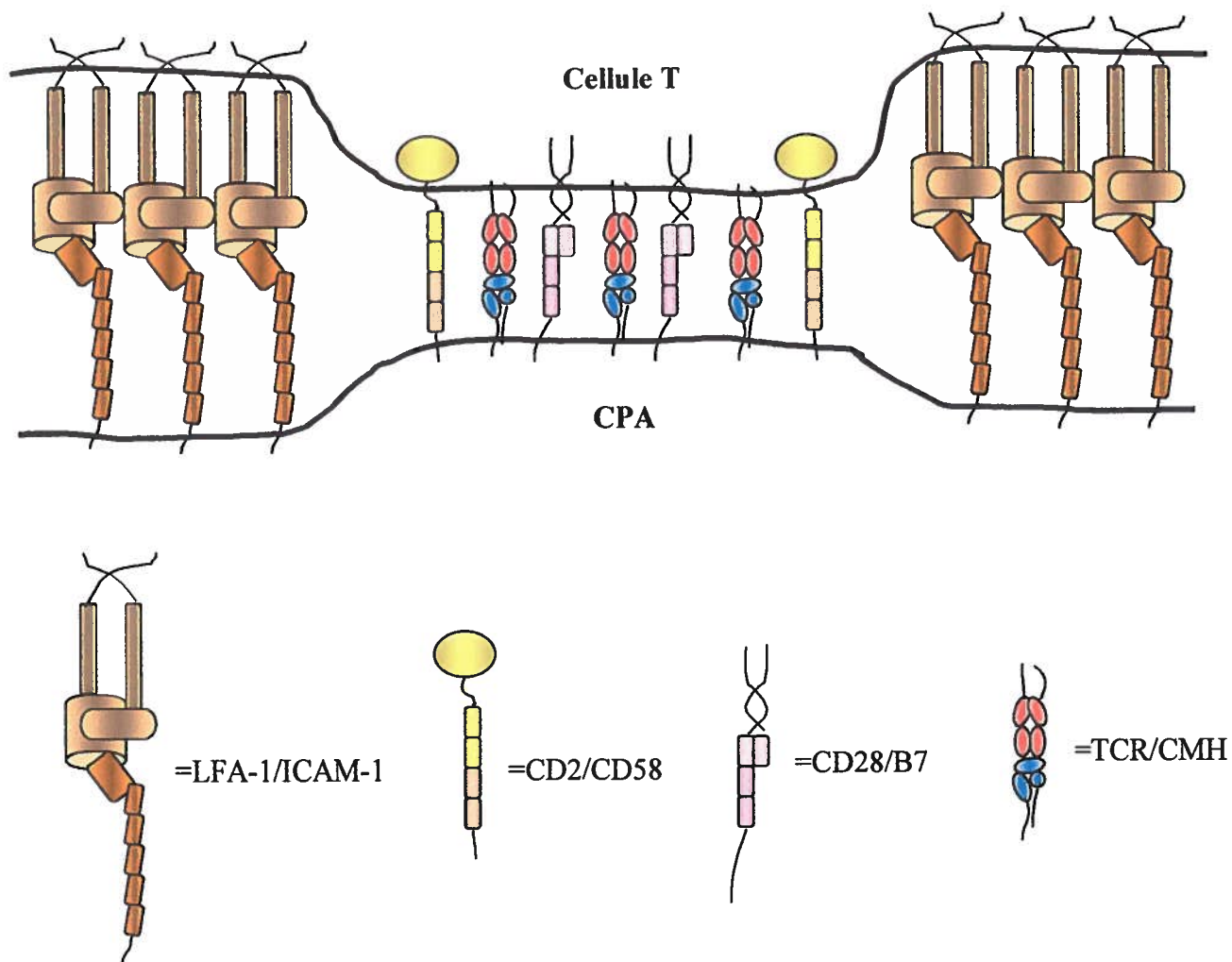
Ces études avec des TCR et des complexes p/CMH solubles a également permis de mesurer l'interaction entre ceux-ci. Avec les composantes solubles, il a été possible de réaliser des tests d'interactions récepteur-ligand avec la technologie de résonance plasmatique en surface (SPR-surface plasmon resonance). Ces études ont permis de

caractériser la liaison TCR/pCMH comme étant de faible affinité, avec une cinétique lente et avec de haut niveau de réactivité croisée (Davis *et al.*, 1998; Willcox *et al.*, 1999).

#### 1.3.2.1 Le contact physiologique

Les différents paramètres décrits précédemment concernent le contact d'un récepteur de cellule T sous forme soluble avec un complexe peptide/CMH tout aussi soluble. Or, dans un contexte physiologique, le contact s'établit plutôt entre deux cellules et implique donc plusieurs autres protéines. Il est connu depuis assez longtemps que le TCR avait des co-récepteurs, soit la molécule CD4 et CD8 (Portoles *et al.*, 1989). Ces molécules reconnaissent respectivement les CMH de classe II et de classe I. Les co-récepteurs n'orientent pas la liaison du TCR avec un complexe peptide/CMH mais stabilisent, renforcent plutôt une liaison déjà existante. La liaison du TCR avec son ligand est indépendante de la liaison de CD4 ou CD8 avec un CMH (Gao *et al.*, 2002).

Il est vrai que les molécules CD4 et CD8 sont impliquées directement dans la formation du complexe TCR/pCMH mais d'autres protéines interviennent également de manière indirecte. Il a été démontré, il y a quelques années, que la région de contact entre une cellule T et une CPA contenait différentes protéines dans des regroupements particuliers. Cette région de contact est une synapse immunologique (Delon, 2000). La synapse immunologique est un contact complexe qui comprend plusieurs étapes de formation et implique divers types de molécules (Bromley *et al.*, 2001). La synapse est en fait composée de plusieurs regroupements supramoléculaires de molécules activatrices nommé SMAC (supramolecular activation cluster) (**Figure 6**). Au centre de la synapse, les cSMAC sont enrichis de deux à trois fois en TCR et en complexes peptide/CMH (Grakoui *et al.*, 1999; Monks *et al.*, 1998). On y retrouve aussi de petites molécules comme CD2 et CD58. En périphérie on retrouve plutôt des molécules d'adhésion comme l'intégrine LFA-1 et son ligand ICAM-1 (Grakoui *et al.*, 1999). L'anneau formée en périphérie aurait pour but d'éloigner les molécules avec des trop gros domaines extracellulaire qui pourrait empêcher le contact TCR/pCMH qui rapproche les cellules à environ 15 nm (van der Merwe, 2000).



**Figure 6. Schéma de la synapse immunologique.** Adapté de (Bromley *et al.*, 2001)

## 1.4 PRODUCTION DE TCR CHIMÉRIQUES

L'obtention de complexes cristallographiés est difficile puisque le TCR n'existe pas sous forme soluble comme c'est le cas pour les immunoglobulines, les récepteurs de cellules B. Pour obtenir des TCR solubles il a fallu attendre le développement de la biologie moléculaire. Les premières structures d'anticorps remontent à la fin des années 70, début des années 80 (Amzel et Poljak, 1979; Davies et Metzger, 1983) alors qu'il a fallu attendre jusqu'en 1996 pour obtenir un hétérodimère de TCR (Garcia *et al.*, 1996). Des fragments de TCR que ce soit des domaines, V $\alpha$  et V $\delta$  ou encore une chaîne, la chaîne  $\beta$ , ont été produits à défaut de pouvoir le produire en entier. Depuis, il n'y a toujours pas eu d'explosion du nombre de structure comme ce fut le cas pour les anticorps, pour la simple raison qu'il n'existe pas encore de méthode générale efficace pour tous les TCR.

Certaines caractéristiques des TCR, en plus de sa forme uniquement membranaire, compliquent la tâche lors de l'expression de celui-ci. Premièrement, le TCR est un hétérodimère et le pairage de ses chaînes n'est pas très efficace (faible affinité) comparativement aux anticorps. De plus, le TCR est stabilisé par le complexe CD3 lors de son expression à la surface des cellules. Afin de remédier à ces contraintes, plusieurs approches ont été tentées. Certains ont lié les domaines extracellulaires à un lien clivable, naturel ou ajouté, comme le lien GPI (Corr *et al.*, 1994; Turner *et al.*, 1990), ou encore la partie transmembranaire et cytoplasmique de la chaîne- $\zeta$  CD3 (Chung *et al.*, 1994; Engel *et al.*, 1992; Seth *et al.*, 1994). D'autres ont fusionné les domaines extracellulaires au domaine constant des anticorps (Gregoire *et al.*, 1991; Weber *et al.*, 1992) ou à des motifs leucines (leucine zippers) (Chang *et al.*, 1994). Des équipes ont même complètement évité le problème de pairage en exprimant uniquement les domaines variables (V $\alpha$ V $\beta$ ) sous la forme d'un scFv (Grégoire, Malisen et Mazza, 1996) ou encore sous la forme d'un TCR de trois domaine (V $\alpha$ V $\beta$ C $\beta$ ) (Chung *et al.*, 1994; Plaksin *et al.*, 1997). Dans ces cas, les domaines variables étaient liés par une charnière flexible. Il a été démontré que la région constante pouvait avoir un rôle dans le bon repliement et/ou la stabilisation du scTCR (Chung *et al.*, 1994).



La difficulté majeure dans la production de TCR demeure d'obtenir une grande quantité de TCR dans la bonne conformation. Lors de production pour la cristallographie, l'homogénéité des sucres ajoutés au TCR, par N-glycosylation, est également un facteur important. Presque tous les systèmes d'expressions ont été utilisés. Le plus répandu est l'expression dans *E. coli*, un système qui permet de haut niveau d'expression à faible coût et qui élimine également la présence des sucres qui sont habituellement ajoutés par glycosylation. La majorité des TCR produit à l'aide de ce système a été reformée à partir de corps d'inclusion (Ding *et al.*, 1998; Garboczi *et al.*, 1996; Hennecke *et al.*, 2000; Reinherz *et al.*, 1999). Le processus de renaturation est une technique empirique qui ne donne pas toujours de bon rendement. Une seule équipe a réussi à produire un hétérodimère de TCR sécrété par *E. coli* avec de bon rendement (Golden *et al.*, 1997). Les cellules d'insecte, de *Drosophila melanogaster*, ont aussi été employées, principalement pour son système de glycosylation plus simple que celui des cellules de mammifère. Les protéines y sont généralement glycosylées de manière plus petite et plus simple (Roberts *et al.*, 1998). Pour l'instant un seul TCR, le 2C, a été cristallographié suite à une production avec des cellules d'insecte (Garcia *et al.*, 1996). L'infection au baculovirus a aussi été utilisée comme système d'expression avec les cellules sf9 ou High 5 (Chang *et al.*, 1994; Kappler *et al.*, 1994). Certaines équipes ont également utilisé les cellules de mammifères. Parfois un ou plusieurs sites de N-glycosylation ont été éliminés de la séquence du TCR pour favoriser la formation de bons cristaux. Les cellules myéломateuses, COS ou CHO sont quelques-unes des cellules qui ont été utilisées. Afin d'augmenter l'efficacité de sécrétion d'un TCR, une équipe a même utilisé la présentation en surface (yeast surface display) de levure (*S. cerevisiae*) afin de prédire la stabilité thermodynamique de TCR ayant des mutations (Shusta *et al.*, 1999).

Peu de TCR ont été produit en quantité et en qualité intéressante pour être cristallographié (**Tableau 1**) mais plusieurs tentatives, alliant une ou plusieurs des approches mentionnées ci haut, ont été utilisées pour ces mêmes TCR ou pour d'autres. Sept années après la première structure, la production de TCR soluble est encore une approche empirique et fastidieuse où la solution est presque spécifique à chaque TCR.

**Tableau 1. Liste des TCR $\alpha\beta$  cristallographiés.**

TCR	lié complexe p/CMH	Forme	Système d'expression	Référence
A6	HLA-A2/Tax	Hétérodimère	<i>E. coli</i> (corps d'inclusion)	(Garboczi <i>et al.</i> , 1996)
	HLA-A2/TaxP6A HLA-A2/TaxV7R HLA-A2/TaxY8A			(Ding <i>et al.</i> , 1999)
2C	Non	Hétérodimère Motif à leucines	<i>D. melanogaster</i>	(Garcia <i>et al.</i> , 1996)
	H-2K <sup>b</sup> /dEV8			(Garcia <i>et al.</i> , 1996)
	H-2K <sup>b</sup> /SIYR			(Degano <i>et al.</i> , 2000)
N15	Non (Fab-H57)	Hétérodimère	Cellule CHO	(Wang <i>et al.</i> , 1998)
D10	Non	Chaîne unique	<i>E. coli</i> (corps d'inclusion)	(Reinherz <i>et al.</i> , 1999)
	I-A <sup>k</sup> /CA			(Reinherz <i>et al.</i> , 1999)
HA1.7	HLA-DR1/HA HLA-DR4/HA	Hétérodimère	<i>E. coli</i> (corps d'inclusion)	(Hennecke <i>et al.</i> , 2000)
BM3.3	H-2K <sup>b</sup> /pBM1	ScFv	Cellules myélomateuses	(Reiser <i>et al.</i> , 2000)
B7	HLA-A2/Tax	hétérodimère	<i>E. coli</i> (corps d'inclusion)	(Ding <i>et al.</i> , 1998)
KB5-C20	Non (Fab-Desiré 1)	ScFv	Cellules myélomateuses	(Housset <i>et al.</i> , 1997)

## 1.5 MODELE BASÉ SUR LA CELLULE T 2.102

La cellule T 2.102 fait partie d'un modèle basé sur la reconnaissance de l'allèle d de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine de souris ( $Hb\beta^d$ ) par des clones de cellules T et des hybridomes. Les cellules du modèle, dont la cellule T 2.102, reconnaissent comme peptide immunodominant les acides aminés 64 à 76 de l'hémoglobine de souris, Hb(64-76), lorsque présenté par la molécule de classe II I-E<sup>k</sup> (Lorenz et Allen, 1988). La cellule T 2.102 a également été décrite comme reconnaissant les molécules de classe II I-E<sup>P</sup>, définissant par le fait même un modèle d'alloréactivité (Daniel *et al.*, 1998a). L'allomimotope EPM est une séquence de 13 acides aminés mimant le peptide impliqué dans l'alloréactivité de la cellules T 2.102, et ayant été identifié à l'aide d'une banque de peptides combinatoires (Daniel *et al.*, 1998b). La cellule T 2.102 peut donc reconnaître le complexe Hb(64-76)/I-E<sup>k</sup> de façon naturelle et le complexe EPM/I-E<sup>P</sup> par alloreconnaissance. Des lignées cellulaires ainsi que des lignées de souris ont été générées afin de permettre d'étudier les voies d'alloréactivité *in vivo* lors de greffe de peau.

### 1.5.1 Le TCR 2.102

Le complexe Hb(64-76)/I-E<sup>k</sup> a déjà fait l'objet d'études biologiques et biochimiques importantes ainsi que la liaison du TCR 2.102 avec celui-ci (Evavold *et al.*, 1992; Fremont *et al.*, 1996; Lorenz et Allen, 1988). Il est connu que quatre résidus du peptide sont impliqués dans la liaison avec le CMH, et cinq avec le TCR. De plus, c'est le CDR3 qui est principalement implique dans la reconnaissance. Dans le cas de la liaison du TCR 2.102 avec EPM/I-E<sup>P</sup>, les caractéristiques biologiques ont aussi été étudiées (Daniel *et al.*, 1998b). Il en a été conclu que les résidus polymorphiques situés sur les hélices  $\alpha$  de la molécule de classe II I-E, CMH allogénique dans le modèle, participent également lors du contact. Leur participation modifie probablement le rôle des autres points de contact ce qui a comme conséquence d'élargir le spectre de spécificité pour la portion centrale du peptide. Les résidus P3 et P5, qui sont au centre du contact avec le TCR sont spécifiques mais beaucoup plus flexible que dans la liaison avec

Hb(64-76)/I-E<sup>k</sup>. L'obtention du sc2.102 sous une forme soluble cristallisable serait très utile pour confirmer et compléter les connaissances en déterminant l'orientation du TCR lors du contact avec les différents ligands et les points réels de contacts. La forme soluble permettrait également de déterminer avec différents tests, l'affinité du TCR2.102 avec les ligands ainsi que les vitesses d'association ( $K_{on}$ ) et de dissociation ( $K_{off}$ ). Toutes ces informations permettraient de mieux comprendre les différences et similitudes d'interaction entre l'alloligand et le ligand.

## **2 MATÉRIEL & MÉTHODES**

**Liste des produits commerciaux utilisés**

2- $\beta$ -mercaptoéthanol (ICN)  
Acétate de potassium (ICN)  
Acétate de sodium (J.T. Baker Chemical)  
Acide acétique glaciale (Fisher)  
Acrylamide (ICN)  
Agar (ICN)  
Agarose (Fisher)  
Ampicilline (ICN)  
*Ase* I (New England BioLabs)  
Azide de sodium (Sigma)  
*Bam*H I (New England BioLabs)  
Bleu brillant de coomassie R250 (Sigma)  
Bleu de bromophénol (Sigma)  
Bromure d'éthidium (ICN)  
BSA (Fisher)  
BSA réaction enzymatique (New England BioLabs)  
*Bsp*H I (New England BioLabs)  
*Bst*B I (New England BioLabs)  
DMEM (Gibco BRL)  
dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech)  
*Dpn* I (BOEHRINGER MANNHEIM)  
*Eco*R I (Amersham Pharmacia Biotech)  
*Eco*R V (New England BioLabs)  
EDTA (ICN)  
Éthanol (Fisher)  
Extrait de levure (ICN)  
GENECLEAN II (BIO 101, Inc).  
GENECLEAN Spin Kit (BIO 101, Inc)  
Geneticin® (G-418) (Gibco BRL)  
Glucose (BDH)  
Gluta-MAX™-1 (Gibco BRL)  
Glycérol (ICN)  
Glycine (Sigma)  
*Hind* III (Amersham Pharmacia Biotech)  
*Hpa* I (New England BioLabs)  
Imidazole (ICN)  
Interleukine-2 (R&D System)  
IPTG (ICN)  
Kanamycine (ICN)  
KCl (Merck)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T. Baker Chemicals)  
Lysozyme (ICN)  
MEM $\alpha$  (Gibco BRL)

Méthanol (Fisher)  
N'N'-bis-méthylène-acrylamide (ICN)  
NaCl (ICN)  
NaOH (J.T. Baker Chemical)  
*Nco* I (New England BioLabs)  
*Nde* I (New England BioLabs)  
*Not* I (Amersham Pharmacia Biotech)  
Persulfate d'ammonium (Sigma)  
*Pfu* (Stratagene)  
Phosphatase alcaline-CIP (Amersham Pharmacia Biotech)  
PI-PLC (Sigma)  
Puromycine (Sigma)  
RNAase pancréatique sans DNAase (Roche BOEHRINGER MANNHEIM)  
RPMI 1640 (Gibco BRL)  
*Sal* I (Amersham Pharmacia Biotech)  
SDS (ICN)  
Sérum bovin de veau- CBS (HyClone)  
Sérum bovin foetal- FCS (HyClone)  
*Sma* I (GibcoBRL)  
Sodium de phosphate (Fisher)  
*Stu* I (Amersham Pharmacia Biotech)  
Sulfate de nickel (NiSO<sub>4</sub>) (ICN)  
T4 DNA ligase (Gibco BRL)  
T4 DNA polymérase (New England BioLabs)  
T4 polynucléotide kinase (New England BioLabs)  
TEMED (ICN)  
Tétracycline (BOEHRINGER MANNHEIM)  
Thrombine (Novagen)  
Thymidine (méthyl-<sup>3</sup>H) (ICN)  
Tris base (Roche BOEHRINGER MANNHEIM)  
Triton X-100 (ICN)  
Tryptone peptone (DIFCO)  
*Vent* (New England BioLabs)  
*Xba* I (Amersham Pharmacia Biotech)  
*Xho* I (Amersham Pharmacia Biotech)  
Xylène cyanol FF (Sigma)  
Zéocin™ (Invitrogen)

## 2.1 CELLULES

### 2.1.1 Souches de *E. coli*

Les différentes souches utilisées ont été cultivées à 37°C et avec du milieu LB (Luria-Bertani) (1% (p/v) NaCl, 1% (p/v) Tryptone, 0,5% (p/v) extrait de levure, ajout de 1,5% (p/v) agar pour les milieux solides, autoclavé). Les cultures liquides ont été oxygénées par agitation à 250 rpm. Des concentrations de 50 µg/ml d'ampicilline et 30 µg/ml de kanamycine ont été utilisées pour les cellules transformées avec un vecteur. Les souches utilisées ainsi que leur génotype sont détaillées à la **Tableau 2**.

### 2.1.2 Cellules de mammifère

Toutes les cellules ont été incubées dans une étuve à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub> dans une atmosphère humide. Les cellules adhérentes ont été décollées avec un grattoir à cellules ou avec du versène (EDTA 0.01 M dans du PBS 1X (NaCl 0,8% (p/v), KCl 0,02% (p/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,024% (p/v), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,268% (p/v) à pH7.4)). Le détail des cellules utilisées et de leur entretien spécifique est décrit à la **Tableau 3**.

## 2.2 VECTEURS

Trois vecteurs d'expression (pET-32b, pET-43.1b et pcDNA3.1) ainsi qu'un vecteur de clonage (pBluescript® SK-) ont été utilisés lors de la construction des vecteurs d'expression du sc2.102. Trois autres (2.102α/pSK-, TCRβshuttle et scTCR2.102/pSK-) ont servi de base pour la construction de la séquence même du sc2.102. Le scTCR2.102/pSK- a été construit en joignant la séquence de la région variable de la chaîne α (V4α) au domaine variable et constant de la chaîne β (Vβ1Cβ1) à l'aide d'une séquence qui permet l'expression d'une région charnière composée du motif G<sub>4</sub>S répété trois fois. Les vecteurs sont détaillés à la **Tableau 4**.



**Tableau 2. Détails des différentes souches de *E. coli* utilisées.**

Cellules	Génotype
XL1Blue	<i>SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup></i> F'(proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet <sup>r</sup> )) (25 μg tétracycline/ml)
DH10β	Δ( <i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i> ) <i>mcrA recA1</i>
BL21TrxB(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm trxB15 : :Kan</i> (DE3) (15 μg kanamycine/ml)

**Tableau 3. Détails des différentes cellules de mammifère utilisées.**

<b>Cellules</b>	<b>Description</b>	<b>Entretien</b>	
COS-7	Fibroblaste de rein de singe vert d'Afrique transformé avec SV40	Milieu DMEM avec 10% de sérum bovin fœtal et 2 mM de GLUTA-MAX™-1	
CHO-K1	Cellules épithéliales d'ovaires de hamster chinois	Milieu MEM $\alpha$ avec 5% de sérum bovin fœtal et 2 mM de GLUTA-MAX™-1	
CH27	Lymphome B de souris		Milieu RPMI 1640 avec 10% de sérum bovin de veau, 0,5 $\mu$ M de 2-ME et 2 mM GLUTA-MAX™-1
CH27 E <sup>P</sup> -EPM	CH27 exprimant le CMH de classe II I-E <sup>P</sup> présentant le peptide EPM	500 $\mu$ g/ml G418 et 200 $\mu$ g/ml Zeocin™	
CH27 mHEL-Hb	CH27 exprimant l'épitope Hb(64-76) dans une construction membranaire	1 $\mu$ g/ml puromycine	
G2B9	Hybridome T 2.102 de souris		
CTL-2	Clone de cellule T dépendant de l'interleukine-2 (IL-2) pour sa croissance	IL-2 (dose variable)	Milieu RPMI 1640 avec 10% de sérum bovin de veau et 2 mM GLUTA-MAX™-1

**Tableau 4. Détails des différents vecteurs utilisés.**

<b>Vecteurs (Origine)</b>	<b>Description</b>	<b>Résistance chez les bactéries</b>
2.102 $\alpha$ /pSK- (P.Allen)	ADNc de la chaîne $\alpha$ du TCR 2.102 dans le vecteur pSK-	Ampicilline
pBluescript® SK- (Stratagene)	Vecteur de sous-clonage, grand site de clonage multiple	Ampicilline
pcDNA3.1 (Invitrogen)	Promoteur CMV et site de polyadénylation BGH	Ampicilline et Zeocin™ chez les cellules de mammifère
pET-32b (Novagen)	Contient la séquence de la thiorédoxineA en N-terminal de la région codante sous le contrôle du promoteur <i>T7lac</i>	Ampicilline
pET-43.1b (Novagen)	Contient la séquence de NusA en N-terminal de la région codante sous le contrôle du promoteur <i>T7lac</i>	Ampicilline
scTCR2.102/pSK- (au laboratoire)	Séquence du sc2.102 (V $\alpha$ 4V $\beta$ 1C $\beta$ 1) sous la forme d'une chaîne unique, dans pSK-	Ampicilline
TCR $\beta$ shuttle (P. Allen)	Séquence du C $\beta$ 1 de TCR avec en C-terminal la séquence permettant l'ajout d'un lien GPI, dans le vecteur pKS-	Ampicilline

## 2.3 ANTICORPS

La liste des anticorps utilisés soit pour le marquage en cytométrie en flux ou pour la révélation d'une immunoempreinte est à la **Tableau 5**. La S-protéine (ribonucléase) biotinylée, protéine de 104 acides aminés obtenue de Novagen, a aussi été utilisée pour identifier les protéines ayant le marqueur S-protéine, une séquence de 15 acides aminés.

## 2.4 OLIGONUCLÉOTIDES

Tous les oligonucléotides ont été synthétisés par le laboratoire de François Shareck de l'INRS-Institut Armand-Frappier à l'exception de T7 term, synthétisés par la compagnie Alpha DNA. La séquence des différents oligonucléotides est disponible à la **Tableau 6**.

## 2.5 MODIFICATION DE L'ADN

### 2.5.1 Digestion avec des enzymes de restrictions

L'ADN a été digéré avec 5 à 20 U des différentes enzymes dans un tampon qui assure une bonne efficacité (recommandation du fournisseur). Le volume final a été toujours suffisant pour maintenir un maximum de 10% de glycérol, provenant des solutions d'enzymes. Pour certaines enzymes de la BSA 1X (0,1 mg/ml) a été ajoutée à la solution de réaction. Les digestions ont été réalisées à 37°C pendant 1 heure sauf exception pour la digestion impliquant *Sal I* qui a été réalisée pendant 16 à 20 heures.

### 2.5.2 PCR

La réaction de polymérisation en chaîne permet l'amplification d'une séquence et aussi la modification de celle-ci à l'aide des amorces. Un PCR d'extension permet d'ajouter des nucléotides à la séquence alors qu'un PCR de chevauchement permet de

**Tableau 5. Liste des anticorps utilisés.**

<b>Spécificité</b>	<b>Clone</b>	<b>Isotype</b>	<b>Conjugué</b>	<b>Provenance</b>
Anti-CD16/32 (Fc $\gamma$ III/II)	2.4G2	IgG2b, k de rat	Non	PharMingen
Anti-chaîne $\alpha$ du CMH I-E de souris	14.4.4	IgG2a de souris	Non	Produit au laboratoire
Anti-chaîne $\beta$ de TCR de souris	H57-597	IgG de hamster	Biotine	PharMingen
Anti-IgG2a de souris(Igh-lb)	5.7	IgG3 de souris Balb/c	Biotine	PharMingen
Anti-IgG de souris	N.D.	N.D.	Peroxydase de rainfort type VI	Sigma
Anti-IgG de souris (H+L)	N.D.	IgG de chèvre	FITC	Cerderlane
Anti-polyhistidine	HIS-1	IgG2a de souris	Non	Sigma
Streptavidine	/	/	FITC	PharMingen

**Tableau 6. Liste des oligonucléotides utilisés.**

<b>Nom</b>	<b>Séquence</b>
2.102PLAP	5'-G GGG CGC CAG ATG GTG ATG GTG ATG-3'
NcoI/NcoI/sc2.102	5'-CCA TGG CCA TGG ACG ATT CAG TG-3'
PLAP+2	5'-CAC CAT CAC CAT CAC CAT CTG GCG CCC CCC GCC-3'
RGS(H) <sub>6</sub>	5'-GAA TTC CTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG GGA GCC CCG TTT TTT CTT GTC TGC TCG GCC CCA-3'
SalI/SalI	5'-GTC GAC GTC GAC ATG AAT ACT TCT CCA GTT TTA G-3'
Sma2.102	5'-CCC CGG GCT ATG GAT TCA GTG AC-3'
T7 term	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'
Xho2.102	5'-CTC GAG CTC GAG ATG AAT ACT TCT-3'

joindre deux séquences ensemble. Pour réaliser la réaction, l'ADN parental a été mis en présence de l'ADN polymérase choisit soit la *Pfu* ou la *Vent*, de leur tampon de réaction 1X, de 50 pmol de l'amorce sens (+) et de l'amorce antisens (-) et de 10 mM de nucléotides (dNTPs) (10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dGTP, 10 mM dCTP dans du Tris-HCl 10 mM). La réaction a débuté en dénaturant les brins parentaux en chauffant à 94°C pendant 2 minutes. Ensuite ont débuté les cycles d'élongation. Le cycle a commencé en chauffant à 94°C pendant 30 secondes pour désapparié les double brins éventuellement formés. Ensuite, les amorces se sont appariées aux brins d'ADN à une température variant entre 50°C et 70°C pendant 30 secondes. Finalement l'élongation a été réalisée à la température optimale pour la polymérase (72°C pour la *Pfu* et 75°C pour la *Vent*) et a durée environ une minute par kb à amplifier. Trente cycles ont été réalisés par PCR. La réaction a été terminée par une amplification supplémentaire de 10 minutes. Pour le PCR de chevauchement, deux PCR d'extension différents ont été réalisés afin de créer le segment situé en 5' et celui situé en 3' de la séquence finale. Ensuite, un troisième PCR a été réalisé afin de joindre les deux segments en utilisant ceux-ci comme ADN de départ afin de créer un brin nouveau comprenant les deux segments. Des amorces, situées à chaque extrémité de la séquence finale, ont aussi été ajoutées afin de générer suffisamment de la nouvelle séquence.

### 2.5.3 Ligation

Dans la construction des différents plasmides, le vecteur déphosphorylé et l'insert, dans un ratio qualitatif de 1 : 3, ont été ligués ensemble en ajoutant 0,5 U de T4 DNA ligase et son tampon de ligation 1X. Lorsque les extrémités étaient franches, l'incubation a été faite à 14°C pour la nuit alors que lorsque les extrémités étaient cohésives, l'incubation a été faite à 22°C pendant une à deux heures.

#### 2.5.3.1 Déphosphorylation/Phosphorylation (kinase)

Pour augmenter les chances d'obtenir une ligation réussie, deux approches ont été employées. Premièrement, les vecteurs ont été déphosphorylé afin d'éviter que ceux-ci ne se liguent avec eux-même. Le vecteur a été mis en présence phosphatase alcaline

d'intestin de veau pendant 30 minutes à 37°C et l'enzyme a ensuite été inactivée pendant 15 minutes à 85°C. Deuxièmement, certaines amorces ont été kinasées afin d'augmenter l'efficacité de ligation d'un produit de PCR avec un vecteur aux extrémités franches. Les amorces ont été mises en présence de T4 polynucléotide kinase qui a été activée pendant 30 minutes à 37°C et inactivée par la suite pendant 20 minutes à 75°C.

## **2.6 TRANSFORMATION DE L'ADN DANS *E. COLI***

### **2.6.1 Préparation des bactéries compétentes**

Il est important de préparer les bactéries en fragilisant leur membrane pour permettre une bonne transformation de celles-ci avec l'ADN. Un *inoculum* a d'abord été étalé sur un plat de Pétri et incubé pour la nuit. Une colonie isolée a été prélevée pour ensemercer 3 ml de milieu SOB sans Mg (2% (p/v) bacto-tryptone, 0,5% (p/v) extrait de levure, 0,05% (p/v) NaCl, 0,250 mM KCl, autoclavé) avec l'antibiotique approprié et la culture a été incubée pendant 6 à 8 heures. Cette culture a été utilisée pour obtenir 400 ml de culture dont la densité optique à 600 nm était de 0,6 à 0,7 (phase exponentielle de croissance). La mesure a été faite avec l'appareil LKB-Ultrospec III de Pharmacia (Amersham Pharmacia Biotech). Les bactéries ont été placées sur glace pendant 30 minutes et ensuite centrifugées à 4000xg pendant 20 minutes à 4°C. Le culot de bactéries a été remis en suspension dans 125ml ddH<sub>2</sub>O stérile froide et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le culot a été alors remis en suspension dans 125ml de glycérol 10% (v/v) froid et centrifugé. Le culot a été remis en suspension dans le glycérol résiduel et le volume amené jusqu'à 1,5ml avec le glycérol 10% (v/v). Des aliquotes de 50µl ont été congelées dans un mélange de glace sèche et d'éthanol et placées à -80°C.

### **2.6.2 Transformation par électroporation**

Toutes les étapes ont été effectuées sur glace et le plus rapidement possible afin de favoriser l'entrée de l'ADN dans les bactéries. Les souches XL1blue ou DH10β ont été utilisées pour produire les différents vecteurs. Un volume de 20 µl de bactéries



compétentes a été ajouté à 4 µl d'ADN. Ensuite, le mélange a été soumis à un courant électrique grâce à l'appareil Cell-Porator® *E. coli* Pulser de Life Technologies (Invitrogen). Les bactéries ont été récupérées avec 1 ml de milieu LB et incubée de 30 à 45 minutes pour être ensuite étalées sur plat de Pétri.

## **2.7 ANALYSE DE L'ADN**

### **2.7.1 Électrophorèse sur gel d'agarose**

L'ADN à visualiser a d'abord été dilué 1/6 avec du tampon de chargement 6X (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF, 30% glycérol). L'ADN a ensuite été chargé sur un gel d'agarose. Le gel a été réalisé en ajoutant 1% (p/v) d'agarose dans du tampon d'électrophorèse Tris-acétate (TAE) (0,04 M Tris-acétate, 0,001 M EDTA). Du bromure d'éthidium a été ajouté à raison de 0,5 µg/ml afin de marquer l'ADN, et le gel a été coulé dans l'appareil Mini-Sub® cell GT Electrophoresis Cell de Bio-Rad. Le marqueur utilisé a été le 1 Kb DNA ladder de Invitrogen. L'ADN a été visualisé grâce à l'appareil GelDoc 1000 et du logiciel Molecular Analysis, tous deux de BioRad.

### **2.7.2 Séquençage de l'ADN**

Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage. Le séquençage a été réalisé par le laboratoire de François Denis de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

## **2.8 CONSTRUCTION DES VECTEURS**

Lors de la construction des différents vecteurs, les fragments d'ADN utilisés lors de ligation ont été récupérés par extraction à partir de bande d'agarose à l'aide de l'ensemble commerciale GENE CLEAN II ou GENE CLEAN Spin Kit. Le produit de ligation a toujours été transformé dans les bactéries compétentes par électroporation et l'ADN plasmidique a été extrait des clones par mini-préparation Maniatis (Sambrook et Gething, 1989) pour permettre le criblage par digestion avec des enzymes de restrictions.

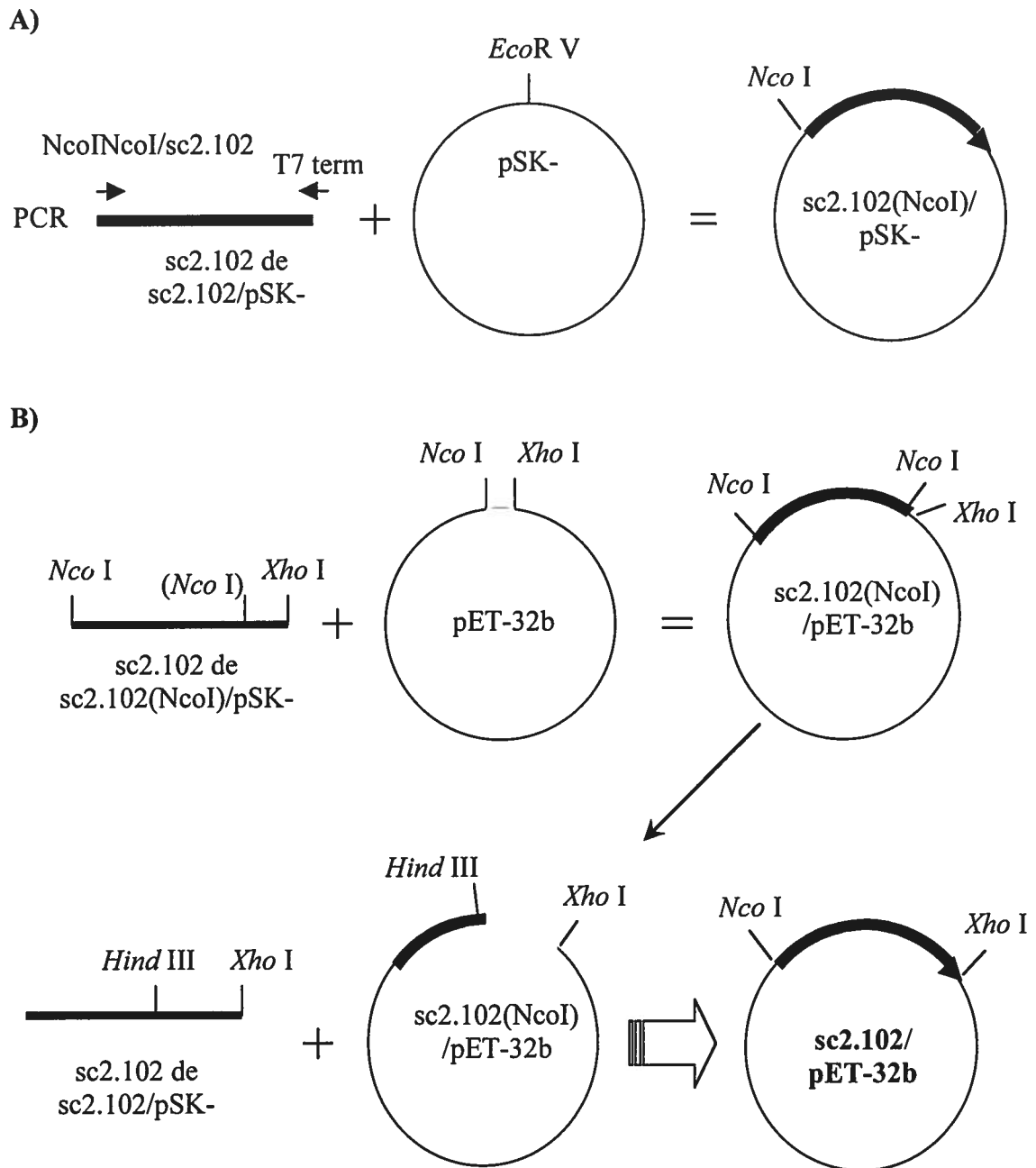
## 2.8.1 sc2.102/pET-32b

### 2.8.1.1 sc2.102(Nco I)/pSK-

Un PCR d'extension a été réalisé sur le vecteur sc2.102/pSK- à l'aide des amorces kinasées NcoI/NcoI/sc2.102 (+), contenant le site Nco I, et T7 term (-) afin de générer un sc2.102 avec un site Nco I en 5' suivi de l'ajout de deux nucléotides, afin de permettre une expression en phase avec le gène de la thiorédoxineA. Le vecteur pSK-, digéré avec *EcoR V*, et le produit de PCR sc2.102(NcoI) ont été ligués ensemble et les clones criblés en effectuant une digestion avec *Xho I* et *Nco I* pour confirmer la présence du sc2.102 (**Figure 7A**).

### 2.8.1.2 Sous-clonage dans pET-32b

Le sc2.102 a été cloné dans le vecteur pET-32b puisque celui-ci permet l'expression d'une protéine en fusion en C-terminale avec la thiorédoxineA. Le vecteur pET-32b, digéré *Xho I* et *Nco I*, ainsi que le sc2.102(NcoI), du vecteur sc2.102(NcoI)/pSK- digéré *Xho I* et *Nco I* ont été ligués ensemble. Les clones ont été criblés en digérant l'ADN avec *Xho I* et *Nco I* afin de confirmer la présence du sc2.102. Puisqu'un site Nco I était présent avant la fin du sc2.102, la dernière portion était manquante. La correction a été effectuée en remplaçant la séquence de la construction erronée par la séquence complète présente dans le vecteur sc2.102(Nco I)/pSK-. Le vecteur sc2.102(Nco I)/pET-32b, digéré *Hind III* et *Xho I*, et le fragment *Hind III/Xho I*, du vecteur sc2.102/pSK- digéré *Hind III* et *Xho I*, ont été ligués ensemble. Les clones ont été criblés en digérant l'ADN avec *Hind III* et *Xho I* (**Figure 7B**). Une midi-préparation d'ADN plasmidique a été réalisée à l'aide de l'ensemble commercial MidiPrep.



**Figure 7. Schéma de la construction du vecteur *sc2.102/pET-32b*. Construction du vecteur A) *sc2.102(NcoI)/pSK-*, B) *sc2.102/pET-32b*.**

## 2.8.2 sc2.102/pET43.1b

### 2.8.2.1 sc2.102(Sma I)/pSK-

Un PCR d'extension a été réalisé sur le vecteur sc2.102 /pSK- avec les amorces kinasées sma2.102 (+), contenant le site Sma I, et T7 terminator (-) afin de générer le sc2.102 avec une site Sma I en 5'. Le vecteur pSK-, digéré *EcoR* V, et le produit de PCR sc2.102(Sma I) ont été ligués ensemble et les clones ont été criblés en digérant l'ADN avec *Xho* I afin de vérifier la présence du sc2.102(Sma) (**Figure 8A**).

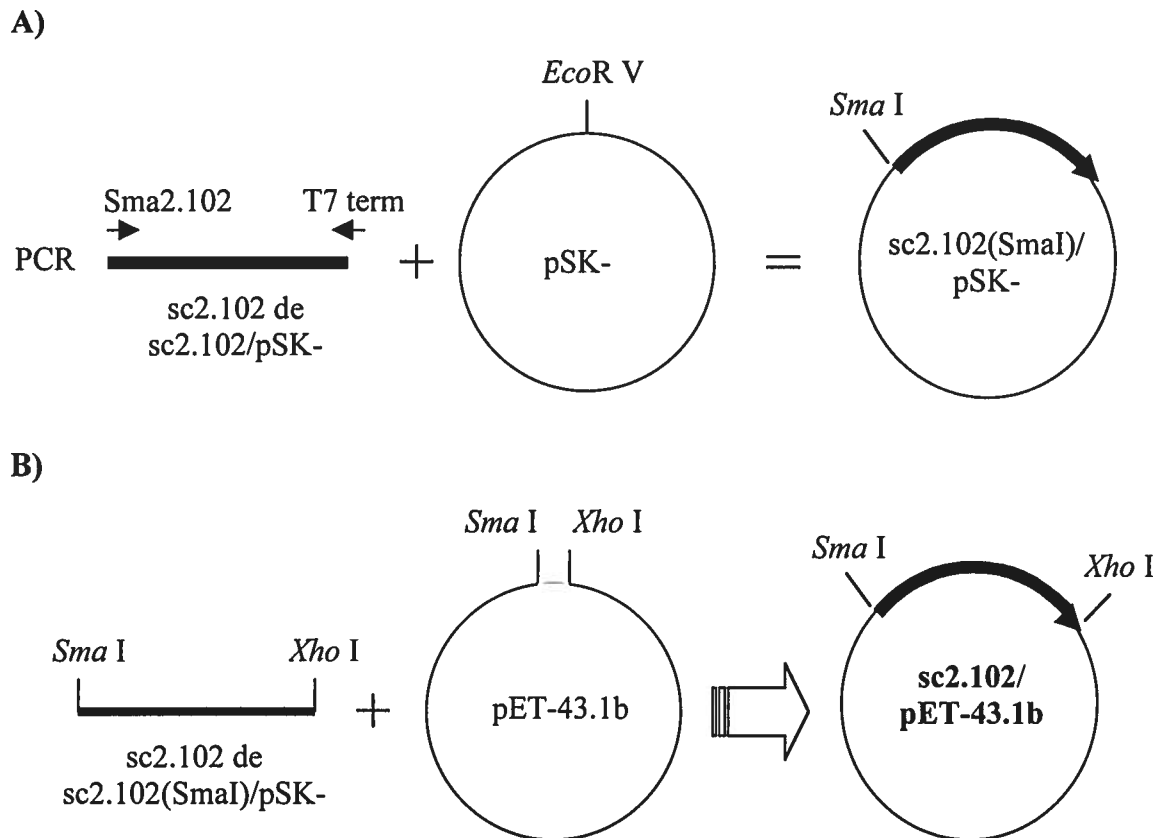
### 2.8.2.2 Sous-clonage dans pET-43.1b

Le sc2.102 a été cloné dans le vecteur pET-43.1b puisque celui-ci permet l'expression d'une protéine en fusion en C-terminale avec la protéine NusA. Le vecteur pET-43.1b, digéré *Sma* I et *Xho* I, ainsi que le sc2.102(Sma), du vecteur sc2.102(Sma)/pSK- digéré *Sma* I et *Xho* I, ont été ligués ensemble (**Figure 8B**). Les clones ont été criblés en digérant l'ADN avec *Xho* I pour confirmer le succès de la ligation . Une midi-préparation d'ADN plasmidique a été réalisée à l'aide de l'ensemble commercial MidiPrep.

## 2.8.3 sc2.102PLAP/pcDNA3.1

### 2.8.3.1 sc2.102L/pSK-

La séquence codant pour le peptide signal a d'abord été ajoutée au sc2.102. Le vecteur 2.102 $\alpha$ /pSK- a été digéré avec *EcoR* I et *Nde* I afin de récupérer la séquence du peptide signal. Le vecteur sc2.102/pSK- a été digéré avec *Nde* I et *Xho* I pour obtenir le sc2.102. Le vecteur pSK- a aussi été digéré avec *EcoR* I et *Xho* I et ligué aux fragments *EcoR* I/*Nde* I et *Nde* I/*Xho* I du sc2.102 (**Figure 9A**). Les clones ont été criblés en digérant l'ADN avec *EcoR* I et *Xho* I pour vérifier la construction du sc2.102L (avec le peptide signal- leader).



**Figure 8. Schéma de la construction du vecteur sc2.102/pET-43.1b.** Construction du vecteur A) sc2.102(Sma I)/pSK-, B) sc2.102/pET-43.1b.

### 2.8.3.2 sc2.102RGS6H/pSK-

Un PCR d'extension a été réalisé sur le vecteur sc2.102L/pSK- avec les amorces kinasées SalISalI (+) et RGS(H)<sub>6</sub> (-), contenant la séquence codant pour le motif RGS(H)<sub>6</sub> qui permet la reconnaissance à l'aide d'un anticorps, et également pour trois lysines qui augmentent la solubilité et la stabilité d'un scTCR (Garcia *et al.*, 1997) afin de générer le sc2.102RGS6H. Le vecteur pSK-, digéré *EcoR* V, et le sc2.102RGS6H ont été ligués ensemble (**Figure 9B**) et les clones ont été criblés en digérant l'ADN avec *EcoR* I pour vérifier la présence du sc2.102RGS6H.

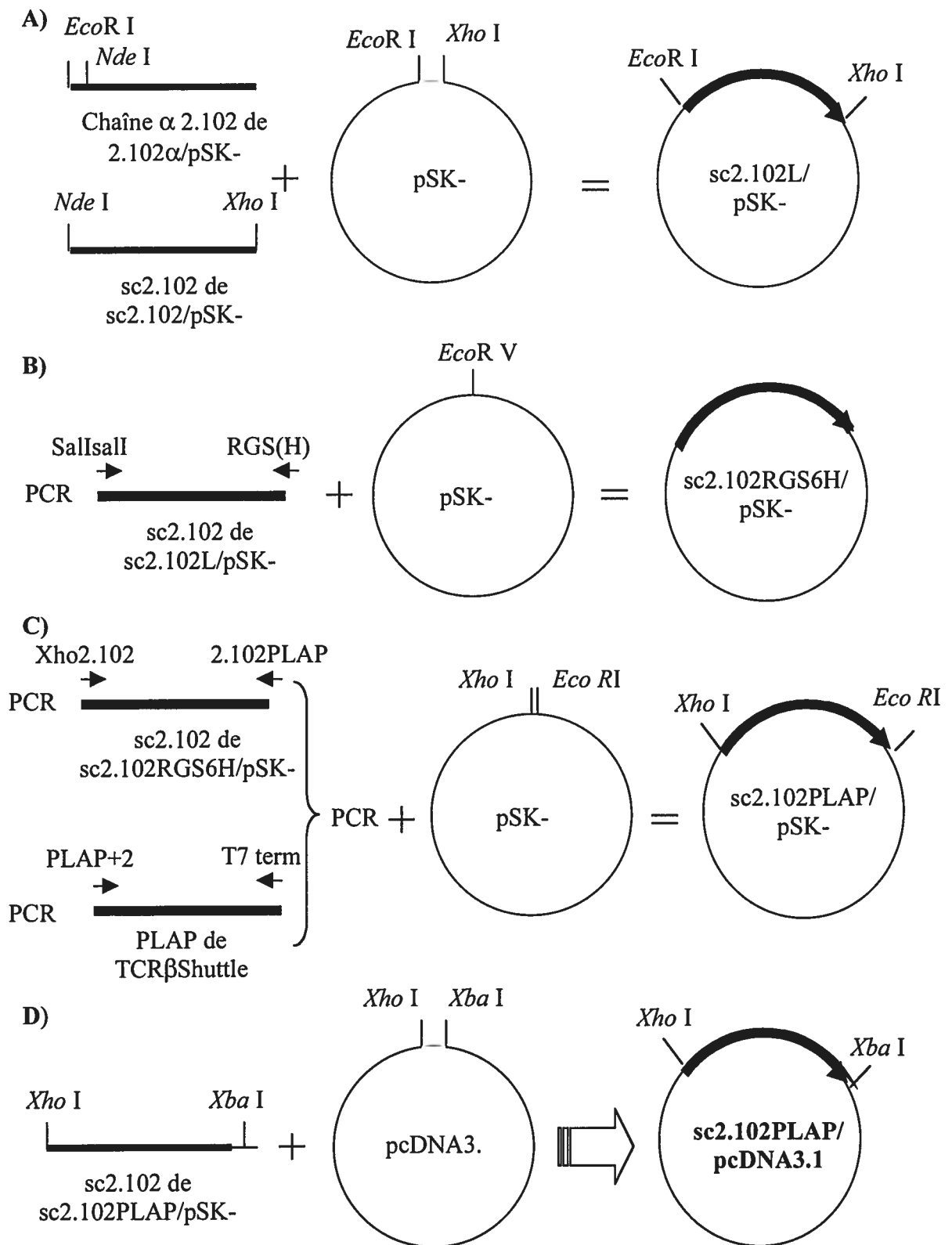
### 2.8.3.3 sc2.102PLAP/pSK-

L'ajout de la séquence codant pour un site (PLAP) permettant le transfert du lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) a été fait par PCR de chevauchement. Le premier PCR fut réalisé sur le vecteur sc2.102RGS6H/pSK- à l'aide des amorces Xho2.102 (+) et 2.102PLAP (-) contenant la séquence de chevauchement afin de générer le fragment 5', sc2.102. Le deuxième PCR a été réalisé sur le vecteur TCRβshuttle à l'aide des amorces PLAP+2 (+) contenant la séquence de chevauchement et de T7 term (-) afin de générer le fragment 3', PLAP. Un troisième PCR fut réalisé afin de joindre les deux fragments et de créer le fragment en entier. Ce troisième PCR fut réalisé sur les fragments sc2.102 (5') et PLAP (3') à l'aide des amorces Xho2.102 (+) et T7 term (-) afin de générer le sc2.102PLAP. Le sc2.102PLAP produit par PCR, digéré *Xho* I et *EcoR* I, ainsi que le vecteur pSK-, digéré *Xho* I et *EcoR* I, ont été ligués ensemble (**Figure 9C**). Les clones ont été criblés en digérant l'ADN avec *Xho* I et *EcoR* I afin de vérifier la présence du sc2.102PLAP.

### 2.8.3.4 Sous-clonage dans pcDNA3.1

Le sc2.102PLAP a été cloné dans le vecteur pcDNA3.1 puisqu'il permet une expression constitutive dans les cellules eucaryotes. Le vecteur sc2.102PLAP/pSK- et le vecteur pcDNA3.1 ont été digérés avec *Xho* I et *Xba* I, ligués ensemble (**Figure 9D**) et les clones ont été criblés en digérant l'ADN avec *Xho* I et *Xba* I. Une maxi-préparation d'ADN fut réalisée à l'aide de l'ensemble commerciale MaxiPrep.

**Figure 9. Schéma de la construction du vecteur sc2.102PLAP/pcDNA3.1.**  
Construction du vecteur A) sc2.102L/pSK-, B) sc2.102 RGS6H/pSK-, C) sc2.102 PLAP/pSK-, D) sc2.102PLAP/pcDNA3.1-.





## **2.9 EXPRESSION DU SCTCR2.102**

### **2.9.1 Induction à l'IPTG chez *E. coli***

Une colonie a été utilisée pour ensemercer 3 ml de milieu contenant 1% de glucose afin d'empêcher l'expression basale. De cette culture, 30  $\mu$ l ont été utilisés pour ensemercer un autre 3 ml de milieu jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm soit de 0,6 (phase exponentielle). L'expression a alors été induite en ajoutant de l'isopropyle  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) à une concentration finale de 0,5 ou 1 mM et l'incubation poursuit jusqu'au temps désiré. Un échantillon a été prélevé, centrifugé pendant 30 secondes à 12000xg et le surnageant ainsi que le culot ont été séparés et congelés à -20°C. Un échantillon a également été prélevé avant induction pour servir de témoin.

### **2.9.2 Transfection des cellules de mammifère avec la Lipofectamine 2000**

Des plateaux 6 puits confluant à 95% ont été préparés en ensemençant ceux-ci avec  $0,3 \times 10^6$  cellules par puits la veille de la transfection. Dans un ratio de 1 : 3 l'ADN et la Lipofectamine 2000 dans du milieu, ont été ajoutés aux cellules et incubées 24 heures. À ce moment, les cellules ont été criblées pour vérifier l'expression transitoire du transgène. Pour l'obtention de lignées cellulaires stables exprimant le transgène, les cellules ont été sélectionnées, clonées et criblées.

## **2.10 PURIFICATION DU SCTCR**

### **2.10.1 Séparation des fractions solubles et insolubles chez *E. coli***

Les protéines cytoplasmiques obtenues suite à l'induction chez *E. coli* ont été récupérées en ajoutant du tampon TE pH 8.0 au culot de bactéries décongelé pour le remettre en suspension. Ensuite, une solution de Triton X-100 à 0,1% (v/v) et du lysozyme à 100  $\mu$ g/ $\mu$ l ont été ajoutés à la suspension bactérienne et le tout a été incubé pendant 15 minutes à 30°C et ensuite déposé sur glace. La suspension a été traitée aux

ultrasons pendant 30 secondes à une intensité d'environ 1,5 et ce, de 2 à 4 reprises ou jusqu'à ce que la solution soit limpide. Le traitement a été réalisé à l'aide de la sonde HS-418 et de l'appareil Sonicator® Ultrasonic Processor XL de Mandel. L'échantillon a été ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 12000xg et les fractions solubles (surnageant) et insolubles (culot) ont été séparées et conservées à 4°C.

## **2.10.2 Clivage enzymatique**

### **2.10.2.1 Thrombine**

Les solutions de protéines ont été traitées avec la thrombine, diluée 1/200 dans son tampon, pendant 16 à 18 heures à 22°C.

### **2.10.2.2 PI-PLC**

Les cellules exprimant les protéines liées à la membrane par un lien GPI ont été mises en suspension dans le tampon de suspension (10mM Tris-HCl et 144mM NaCl à pH 7.4) et la phospholipase C spécifique au phosphatidylinositol (PI-PLC) a été diluée dans le tampon de dilution (tampon de suspension avec 0,05% (p/v) de BSA). Les cellules ont alors été traitées avec la PI-PLC, dans un rapport de volume de 1 : 1, et incubée pendant 3 heures à 37°C sous faible agitation, 100 rpm. Les protéines clivées ont été ensuite récupérées en centrifugeant les cellules à 600xg pendant 5 minutes, les protéines étant dans le surnageant. Les protéines ont été conservées à 4°C.

## **2.10.3 Immunoprécipitation**

Les billes Streptavidine Sepharose™ High Performance de Amersham Pharmacia Biotech ont été lavées au PBS 1X et centrifugées à 12000xg pendant 30 secondes. Les billes ont été lavées encore 2 autres fois. Les billes ont ensuite été couplées à 20µl de S-protéine biotinyllée diluée dans du PBS 1X pendant 16 heures à 4°C sous agitation par inversion à l'aide de l'appareil Roto-Rack® de Fisher. Les billes ont été lavées 3 fois et incubées avec l'extrait de protéine pendant 2 heures à 4°C sous agitation par inversion.

Le surnageant a été conservé à 4°C ainsi que les billes qui ont été préalablement lavées 3 fois avec du PBS 1X.

#### **2.10.4 Chromatographie d'affinité avec chélation de métaux (nickel)**

Une colonne Hi-Trap® chelating de 5ml de Amersham Pharmacia Biotech a été utilisée pour réaliser la chromatographie. Toute la procédure a été réalisée à 4°C en utilisant une seringue pour l'injection et en maintenant un débit d'environ 5 ml/min. La colonne a d'abord été lavée avec 5 volumes ddH<sub>2</sub>O. La colonne a ensuite été couplée au nickel (Ni) en ajoutant 2,5 ml d'une solution de 0,1 M de NiSO<sub>4</sub>. La colonne a été lavée avec 5 volumes ddH<sub>2</sub>O. Le nickel ayant une couleur bleu-vert, il a été facile de confirmer que celui-ci a bien été couplé à la colonne, puisqu'il n'est pas élué avec les lavages.

La colonne a ensuite été équilibrée avec 10 volumes de tampon de départ (0,2 M phosphate de sodium, 0,5 M NaCl à pH 7.4). Tout le volume de l'échantillon a été chargé sur la colonne. La colonne a été lavée avec environ 5 volumes de tampon de lavage (0,2 M phosphate de sodium, 1M NaCl, 0,025 mM imidazole à pH 7.4) jusqu'à ce qu'il ne sorte plus de protéine de la colonne. La présence des protéines a été vérifiée par un dosage aux U.V. (§ 2.11.1). L'éluion des protéines fixées à la colonne a été faite avec 2 volumes de tampon d'éluion (tampon de départ avec 0,5 M imidazole), chaque millilitre (fraction) étant récolté individuellement. Chaque fraction a été par la suite dosée aux U.V. et conservées à 4°C.

La colonne a alors été rééquilibrée avec 5 volumes de tampon de départ. Lors de l'entreposage à court terme, la colonne a été lavée avec 5 volumes d'éthanol 20% et les extrémités fermées afin d'éviter que la colonne ne sèche. Lors de l'entreposage à long terme, le nickel a été enlevé de la colonne avec 5 volumes de tampon de découplage (tampon de départ avec 0,5 M EDTA) et entreposé de la même façon que lors de l'entreposage à court terme.

### **2.10.5 Concentration**

La solution de protéine a été concentrée par ultrafiltration grâce à des Centricon® Plus-20 PL-10 d'Amicon selon les recommandations du fabricant. La concentration a été réalisée à 2500xg et la solution concentrée récupérée par une centrifugation à 1000xg.

## **2.11 ANALYSE DES PROTÉINES**

### **2.11.1 Dosage**

#### **2.11.1.1 Dosage aux U.V.**

Les protéines ont été dosées à une longueur d'onde de 280 nm à l'aide de l'appareil GeneQuant de Pharmacia. La valeur obtenue a été ensuite divisée par un facteur 1.5 afin d'obtenir une concentration en mg/ml.

#### **2.11.1.2 Dosage colorimétrique (Lowry)**

Les protéines ont été dosées à l'aide de l'ensemble commerciale *DC Protein Assay* de BioRad qui modifie légèrement la technique de Lowry (Lowry, 1951). Le dosage a été réalisé selon les instructions du fabricant et la mesure de la densité optique a été réalisée à l'aide de l'appareil Spectronic 1201 de Milton Roy. Le standard utilisé a été la fraction V de la BSA de Pierce.

### **2.11.2 SDS-PAGE**

Pour réaliser une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE), les protéines ont été d'abord diluées, dans un ratio 1 : 1, avec du tampon d'échantillon 2X (100mM Tris-HCL pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 20% (v/v) glycérol, 0,006% (p/v) Bleu de bromophénol et 2% (v/v) 2-mercaptoéthanol) et elles ont été ensuite chauffées dans un bain à 100°C pendant 5 minutes. Les échantillons ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire, le SDS-PAGE Standard Low Range de BioRad, ont été chargés dans le gel de polyacrylamide composé du gel de regroupement de 4%

(0,125 M de Tris-HCL pH 6,8, 0,1% de SDS, 4% d'acrylamide/bis (29,2% (p/v) d'acrylamide et 0,8% (p/v) de N'N'-bis-méthylène-acrylamide), 0,05% (p/v) de persulfate d'ammonium et 0,001% (v/v) de TEMED) et du gel de séparation de 12% [même protocole que le 4% à la différence que 0,375 M de Tris-HCL pH8,8 et 12% d'acrylamide/bis ont été utilisés] montés à l'aide de l'appareil Mini-Protean® II de BioRad. Les échantillons ont été migrés dans du tampon d'électrode (0,3% (p/v) de Tris base, 1,44% (p/v) de glycine et 0,1% (p/v) de SDS ).

### **2.11.3 Coloration au bleu brillant de coomassie R250**

Les protéines contenues dans le gel SDS-PAGE ont été révélées suite à une incubation dans une solution de bleu brillant de coomassie R250 (0,25% (p/v), 45% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique) pendant une heure sous faible agitation, 60 RPM. Le gel a ensuite été décoloré avec la solution de décoloration (40% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique) sous agitation jusqu'à la décoloration désirée. Le gel a été séché à l'aide de l'appareil Gel Slab Dryer de BioRad entre un papier buvard et une membrane de cellulose, tous deux de BioRad et préalablement trempé dans l'eau.

### **2.11.4 Immunoempreinte de type Western**

Un gel SDS-PAGE a été d'abord réalisé (§2.11.2) mais le marqueur utilisé a été le Prestained SDS-PAGE Standard Low Range de BioRad. Les protéines ont été transférées du gel de polyacrylamide à la membrane de nitrocellulose de BioRad à l'aide de l'appareil Mini Trans-Blot® cell de BioRad. Le transfert a été réalisé dans du tampon de transfert (0,58% (p/v) de Tris base, 0,29% (p/v) de glycine, 0,037% (p/v) SDS et 20% (v/v) de méthanol) pendant une heure à 100 Volts. La membrane a ensuite été bloquée dans une solution de PBS 1X contenant 5% (p/v) de lait écrémé pendant une heure à 22°C ou à 4°C pendant 16 à 18 heures et dans les deux cas sous faible agitation, environ 60 RPM. Le marquage a été réalisé en incubant une heure avec chaque anticorps, selon la dilution appropriée dans du PBS 1X-5% de lait écrémé, en lavant après chaque incubation 2 fois 5 minutes suivit de 10 minutes avec du PBS 1X. Le tout a été réalisé à 22°C sous

agitation. La révélation par chimiluminescence a été obtenue avec l'ensemble commercial ECL de Amersham Pharmacia Biotech. La membrane a alors été exposée de 15 secondes à 5 minutes sur films Medical de Konica et les films développés à l'aide de l'appareil MINI-MED/90 de AFP imaging.

### **2.11.5 Marquage en cytométrie en flux**

Entre  $0,5$  et  $1 \times 10^6$  cellules ont été lavées deux fois avec du tampon de cytométrie (PBS1X, 0,1% (p/v) de BSA et 0,02% (p/v) d'azide de sodium) et centrifugées à  $600 \times g$  pendant 5 minutes. Le marquage a été réalisé en incubant 30 minutes sur glace avec chaque anticorps selon la dilution appropriée dans du tampon de FACS, en lavant les cellules 2 fois après chaque incubation. Lorsque l'anticorps était couplé à un fluorochrome l'incubation a été réalisée à la noirceur. À la fin du marquage, les cellules ont été mises en suspension dans du tampon de FACS et conservées à la noirceur jusqu'à leur utilisation (24 heures maximum).

## **2.12 TEST DE FONCTIONNALITÉ DU sc2.102**

### **2.12.1 Multimérisation du sc2.102**

#### **2.12.1.1 sc2.102-Anticorps**

L'objectif de cette approche était de former un complexe théoriquement composé par huit molécules de sc2.102 pour une molécule de streptavidine et de l'utiliser comme un anticorps dans un marquage en cytométrie en flux. Les ratios pour le complexe sc2.102-Ac ont été établis selon le ratio moléculaire 1 streptavidine : 4 anti-chaîne  $\beta$  de TCR biotinylés : 8 sc2.102. Le sc2.102 a été ajouté en saturation pour s'assurer d'un effet de multimérisation. La streptavidine-FITC,  $0,25 \mu\text{g}$ , a été incubé sur glace et à la noirceur avec  $0,5 \mu\text{g}$  de l'anticorps anti-TCR $\beta$  biotinylé pendant 30 minutes. Ensuite, le sc2.102 a été ajouté en saturation ( $10 \mu\text{g}$ ) à cette solution et incubé pour 30 minutes.

### 2.12.1.2 sc2.102-billes

L'utilisation de billes de polystyrène visait à augmenter la densité du sc2.102 et donc l'avidité de l'interaction de celui-ci avec ses ligands ainsi qu'à éliminer les sc2.102 non fixés qui était présent dans la solution des complexes sc2.102-Ac. Les billes de polystyrène avidine couplées à de la fluorescence jaune de Spherotech (SPHERO™ Avidin coated yellow fluorescent particules) ont été lavées avec du PBS1X et centrifugées à 12000xg pendant 30 secondes. L'anticorps anti-chaîne $\beta$  de TCR a été couplé à raison de 0,25  $\mu$ g pour 10  $\mu$ g de billes (recommandations du fabricant) pendant une heure sur glace. Les billes lavées ont ensuite été couplées avec 7  $\mu$ g de sc2.102 pour 10  $\mu$ g de billes afin de saturer l'anti-chaîne  $\beta$  de TCR. Les billes ont été lavées et remises en suspension dans du PBS1X.

### 2.12.2 Test de compétition d'activation d'hybridome T

Dans un plateau 96 puits,  $1 \times 10^3$  cellules présentatrices d'antigène, les CH27, ont été déposées par puit. Ensuite, le peptide Hb(64-76) a été ajouté aux puits contenant les CH27 à des concentrations variant de 1 à 0,003  $\mu$ M dans du milieu de culture. L'hybridome T 2.102 a alors été ajouté aux CH27 chargé du peptide Hb(64-76) à raison de  $2,5 \times 10^3$  cellules par puit. Le sc2.102 a également été ajouté à une concentration fixe dans chacun des puits. Les plateaux ont été incubés pendant 24 heures afin de permettre l'interaction entre les cellules présentatrice d'antigènes et les hybridomes T. Une partie du surnageant a ensuite été transférée dans un nouveau plateau. Le plateau a été placé à  $-70^\circ\text{C}$  pour 1 heure ou à  $-20^\circ\text{C}$  pour un minimum de 24 heures pour permettre de tuer les cellules qui auraient pu être transférées accidentellement.

Les cellules CTLL-2 sevrées d'IL-2 ont été ajoutées aux plateaux à raison de  $5 \times 10^3$  cellules par puits. Pour le témoin positif, 2 ng/ml d'IL-2 ont été ajoutés aux CTLL-2 et aucun IL-2 n'a été ajouté pour le témoin négatif. Les plateaux ont été incubés pendant 16 à 20 heures. Ensuite, de la  $\text{H}^3$ -thymidine a été ajouté à raison de 0,4  $\mu$ Ci par

puits. Le plateau a été incubé de nouveau 16 à 20 heures pour poursuivre la croissance des cellules et marquer celles-ci à la thymidine.

L'ADN des cellules a été absorbé sur un filtre en fibre de verre de Wallac grâce à l'appareil « harvester » de Tomtec. Le compte de radioactivité a été déterminé à l'aide de l'appareil MicroBeta Trilux et du logiciel MicroBeta Windows Workstation, tous deux de Wallac.



### **3 RÉSULTATS**

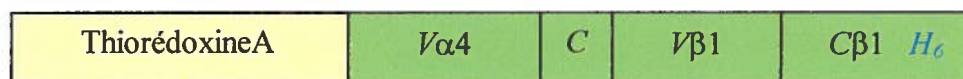
### 3.1 EXPRESSION DU sc2.102 EN FUSION AVEC LA THIORÉDOXINE

La fusion du sc2.102, insoluble lorsqu'exprimé chez *E. coli*, avec une protéine soluble comme la thiorédoxineA avait pour but d'augmenter la solubilité du sc2.102 i.e d'éviter la formation de corps d'inclusion. Il est difficile et empirique de récupérer de corps d'inclusion des protéines dans leur forme native. Le sc2.102, composée dans l'ordre de  $V\alpha 1$ , d'une charnière, de  $V\beta 4$  et de  $C\beta 1$  contenant un marqueur  $H_6$ , a donc été fusionné en C-terminale de la thiorédoxineA dans le vecteur pET-32b (**Figure 10**).

Afin de favoriser le bon repliement du sc2.102, l'expression a été faite dans la souche BL21TrxB(DE3) qui est déficiente pour la thiorédoxine $\beta$  et donc permet la formation de pont disulfure. Puisque même s'il n'existe plus de pont inter-chaîne, il n'y a qu'une seule chaîne, il existe toujours des ponts intrachaînes essentiels au bon repliement de la protéine. La présence de la thiorédoxineA comme protéine de fusion dans un tel système ne nuit pas à la formation des ponts disulfures mais aide plutôt à la catalyse de ceux-ci (Stewart *et al.*, 1998).

L'induction de l'expression a été faite dans les conditions standards, avec 1 mM d'IPTG, mais aussi avec 0,5 mM afin de vérifier si des concentrations plus faibles d'inducteur ne favorisaient pas une expression plus lente et donc une formation de corps d'inclusion moindre. De plus, des températures de croissance inférieures, 30 et 22°C, à la température optimale, 37°C, ont aussi été testées pour ralentir l'expression et donc augmenter la proportion de protéines solubles. Le temps d'induction a également été varié pour vérifier si un temps plus court, en limitant la quantité de protéines produites, ne permettait pas d'accroître le ratio de sc2.102 solubles.

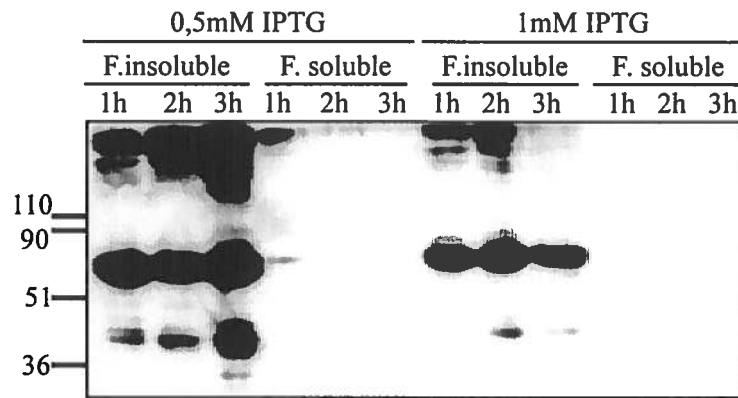
On remarque à la **Figure 11** que le sc2.102 en fusion avec la thiorédoxine se retrouve à environ 60 kDa, valeur légèrement supérieur au 56 kDa attendus, la thiorédoxineA faisant 11 kDa et le sc2.102 a été estimé à 45 kDa. On remarque également que peu importe la température, le temps ou la concentration d'IPTG utilisé lors de l'induction, la protéine se retrouve majoritairement dans la fraction insoluble.



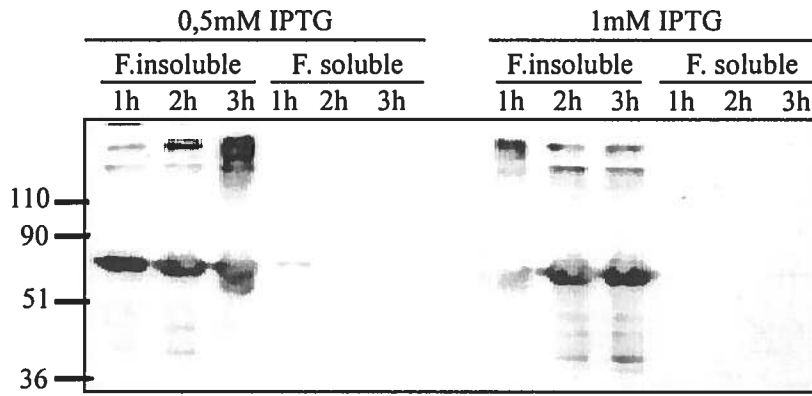
**Figure 10. Organisation de la séquence du sc2.102 en fusion avec la thioredoxineA.** La séquence de la protéine de fusion thioredoxineA est en N-terminal suivit de la séquence codant pour le sc2.102 qui est composée de la région  $V\alpha 1$ , d'une charnière (motif  $G_4S$  répété 3 fois), de la région  $V\beta 4$  et de la région  $C\beta 1$  contenant un marqueur  $H_6$ .

**Figure 11. Expression du sc2.102 en fusion avec la thiorédoxine.** Les bactéries BL21TrxB(DE3) ont été transformées avec le vecteur sc2.102/pET32b et l'expression induite avec 0,5 ou 1mM d'IPTG pendant 1,2,3 ou 20 heures à A) 37°C, B) 30°C ou C) 22°C. Les protéines ont été séparées en fraction soluble et insoluble suite à un traitement au Triton X-100, au lysozyme et aux ultrasons. Leur présence a été révélée par chimiluminescence d'une immunoempreinte de type Western incubée avec l'anticorps anti-polyhistidine (dilution 1/1000) suivit de l'anticorps anti-IgG couplé à la peroxydase du raifort (dilution 1/4000).

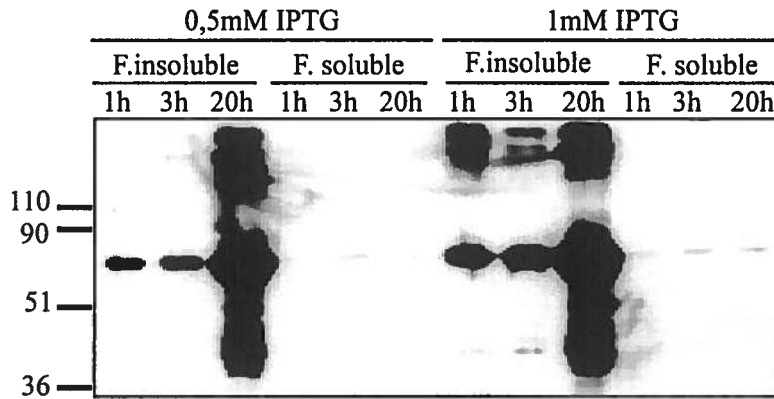
A)



B)



C)



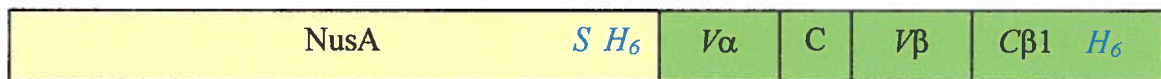
Donc, la fusion avec la thiorédoxine n'a pas permis d'obtenir le sc2.102 sous une forme soluble.

### 3.2 EXPRESSION DU SC2.102 EN FUSION AVEC NUSA

Une deuxième protéine de fusion a été utilisée puisqu'il a été démontré que la protéine NusA a une meilleure capacité que la thioredoxineA à produire en phase soluble des protéines insolubles (Harrison Roger G, 2000). De plus, la protéine NusA, 60 kDa, est plus grosse que le sc2.102, 45 kDa, comparativement à la thiorédoxineA, 11 kDa. Le sc2.102, composée dans l'ordre de  $V\alpha 1$ , d'une charnière, de  $V\beta 4$  et de  $C\beta 1$  contenant un marqueur  $H_6$ , a donc été fusionné en C-terminale de NusA, contenant aussi un marqueur  $H_6$  mais également un marqueur S-protéine, dans le vecteur pET-43.1b (Figure 12). La construction a été exprimée dans les mêmes conditions qu'avec la thiorédoxine.

Après son expression chez *E. coli*, la protéine de fusion se retrouve à une valeur légèrement supérieure aux 105 kDa attendus (Figure 13). On observe qu'à toutes les températures d'induction, la protéine se retrouve à la fois dans la fraction soluble et insoluble. Par contre, plus la température d'induction diminue, plus la proportion de protéines dans la fraction soluble augmente par rapport aux protéines de la fraction insolubles. La température idéale est donc celle de 22°C. On remarque aussi une augmentation de la quantité de protéines produites en fonction du temps d'induction et que ceci a également pour effet d'augmenter la quantité de fragments de dégradation de protéines (bandes inférieurs à 105 kDa). Plusieurs temps d'induction ont été testés (résultats non montrés) pour optimiser le rapport protéines produites et dégradées et les meilleurs résultats ont été obtenus avec une induction de 6 heures. Une concentration de 1 mM d'IPTG a été conservée puisqu'il s'agissait de la concentration standard et qu'une diminution n'avait pas d'effet sur la quantité de protéines produites.

L'expression du sc2.102 en fusion avec NusA a donc permis d'obtenir la protéine de fusion dans la fraction soluble avec des conditions optimales d'induction qui sont de 22°C pendant 6 heures et qui ont été conservées pour la suite des expériences.

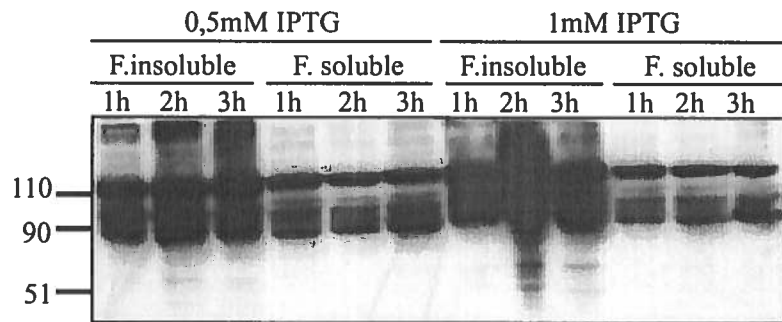


**Figure 12. Organisation de la séquence du sc2.102 en fusion avec NusA.** La séquence de la protéine de fusion NusA contenant un marqueur S-protéine et un H<sub>6</sub> est en N-terminal suivit de la séquence codant pour le sc2.102 qui est composé de la région V<sub>α</sub>1, d'une charnière (motif G<sub>4</sub>S répété 3 fois), de la région V<sub>β</sub>4 et de la région C<sub>β</sub>1 contenant un marqueur H<sub>6</sub>.

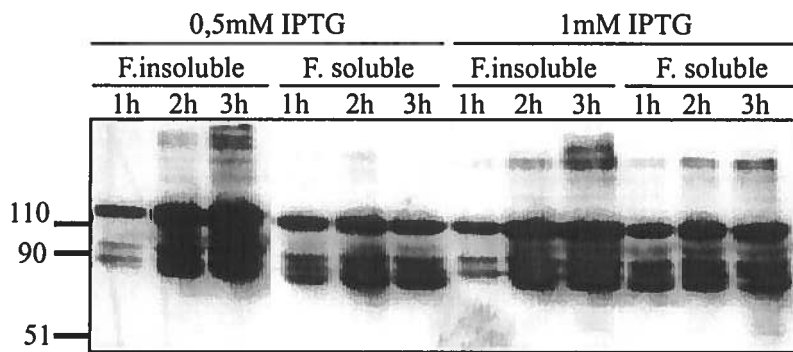
**Figure 13. Expression du sc2.102 en fusion avec NusA.** Les bactéries BL21Trx(DE3) ont été transformées avec le vecteur sc2.102/pET43b et l'expression induite avec 0,5 ou 1mM d'IPTG pendant 1,2,3 ou 20 heures à A) 37°C, B) 30°C ou C) 22°C. Les protéines ont été séparées en fraction soluble et insoluble suite à un traitement au Triton X-100, au lysozyme et aux ultrasons. Leur présence a été révélée par chimiluminescence d'une immunoempreinte de type Western incubée avec l'anticorps anti-polyhistidine (dilution 1/1000) suivit de l'anticorps anti-IgG couplé à la peroxydase du raifort (dilution 1/4000).



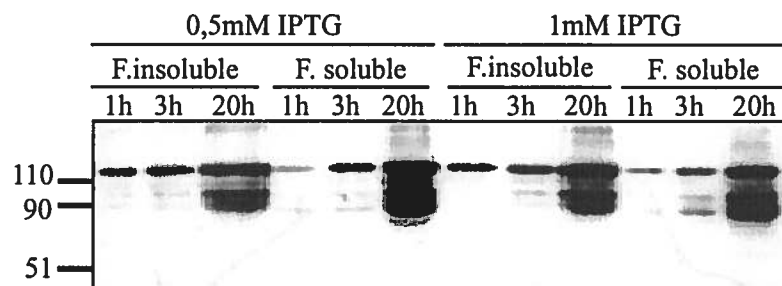
A)



B)



C)



### 3.3 PURIFICATION DU sc2.102 EN FUSION AVEC NusA

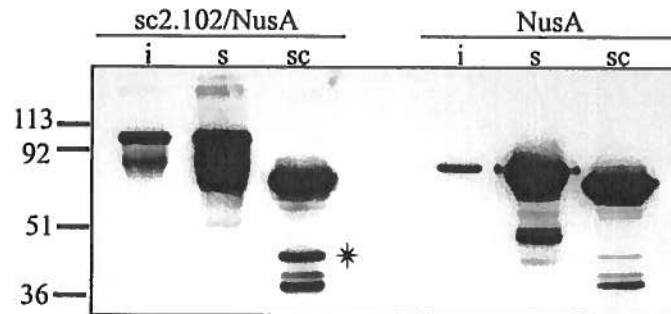
#### 3.3.1 Clivage du sc2.102 de NusA

Suite à l'expression de la protéine de fusion dans les conditions établies précédemment, le sc2.102 a été séparé de NusA par un clivage à la thrombine. Le site de clivage était situé exactement à la jonction entre les deux protéines. Un témoin a été utilisé pour obtenir le patron de clivage à la thrombine de la protéine NusA. La protéine NusA a été produite suite à l'expression du vecteur pET-43b dans les mêmes conditions qui ont été utilisées pour le vecteur sc2.102/pET-43b.

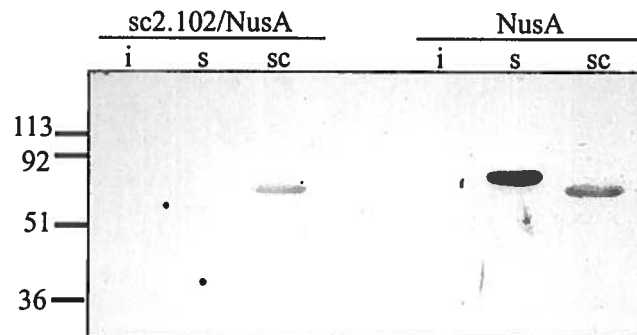
La **Figure 14A** permet d'observer simultanément les deux protéines, NusA et sc2.102, puisqu'elles ont toutes deux été révélées à l'aide de l'anticorps anti-polyhistidines, dirigé contre le marqueur H<sub>6</sub>. Dans cette figure, la protéine de fusion retrouvée à 105 kDa a complètement disparue suite au clivage, ce qui signifie que toutes les protéines ont été clivées. Les protéines résultant du clivage se situent à environ 60, 45, 40 et 38 kDa. Deux bandes seulement étaient attendues, celle de NusA à 60 kDa et celle du sc2.102 à 45 kDa. Il y a donc deux bandes supplémentaires mais elles peuvent être dues aux protéines de dégradations observées auparavant. Étonnamment, le patron de clivage obtenu avec NusA est le même que celui de NusA/sc2.102. La présence de la bande à 45 kDa s'explique difficilement puisqu'elle représente le sc2.102, cependant elle semble présente en plus petite quantité. La révélation avec la S-protéine (**Figure 14B**), marqueur retrouvé uniquement sur NusA, avait pour objectif de confirmer l'appartenance des bandes de 60, 40 et 38 kDa à la protéine NusA. Seules les bandes correspondant à NusA, à 60 kDa, et celle de NusA soluble non-clivée, à 70 kDa ont été révélées. L'absence des autres bandes peut s'expliquer par le fait que le marquage avec la S-protéine semble beaucoup moins sensible que le marquage avec l'anticorps anti-polyhistidine. Seules les bandes qui semblent saturées avec l'anti-polyhistidine ont été révélées avec la S-protéine.

Le clivage de la protéine de fusion NusA/sc2.102 est efficace mais la présence du sc2.102 n'a pu être confirmée.

A)



B)



**Figure 14. Clivage du sc2.102 de la protéine NusA.** Les bactéries BL21Trx(DE3) ont été transformées avec le vecteur sc2.102/pET43b et pET-43b. L'expression a été ensuite induite avec 1mM d'IPTG pendant 6 heures à 22°C. Les protéines ont été séparées en fraction soluble (s) et insoluble (i) suite à un traitement au Triton X-100, au lysozyme et aux ultrasons. Les protéines retrouvées dans les fractions solubles ont été clivées à la thrombine (sc). La présence du sc2.102 (\*) et de NusA a été révélée par chimiluminescence d'une immunoempreinte de type Western incubée avec A) l'anticorps anti-polyhistidine (dilution 1/1000) et l'anticorps anti-IgG couplé à la peroxydase du raifort (dilution 1/4000) et B) la S-protéine (dilution 1/1000) et la streptavidine couplée à la peroxydase du raifort (dilution 1/1000).

### 3.3.2 Immunoprécipitation de NusA (sélection négative)

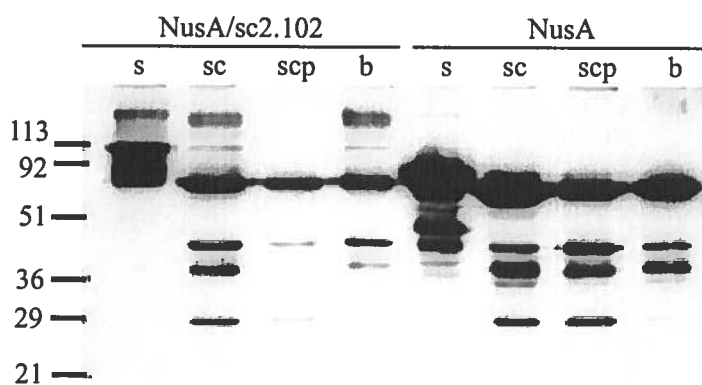
Un enrichissement du sc2.102 a été tenté en éliminant les autres protéines par une immunoprécipitation avec la S-protéine. Le marqueur S-protéine étant spécifique à la protéine NusA, l'immunoprécipitation avait pour but d'isoler, par sélection négative, le sc2.102 des protéines provenant de NusA et de NusA elle-même.

Les billes couplées à la S-protéine ont retenu toutes les protéines présentes, tel qu'illustré à la **Figure 15**. La bande à 45 kDa, correspondant à la masse attendue pour le sc2.102, semble être autant retenue par les billes que les autres protéines. Aucun enrichissement n'est notable dans la solution provenant du sc2.102/NusA

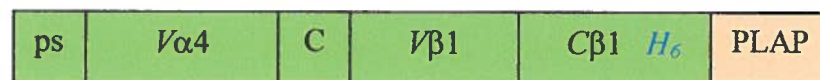
Il est impossible de conclure que le sc2.102 était présent dans la solution de protéines suite au clivage avec la thrombine. Nous n'avons pas pu détecter spécifiquement ni enrichir le sc2.102 dans la solution suite au clivage à la thrombine de la protéine de fusion. Une autre approche a donc été envisagée.

### 3.4 EXPRESSION DU SC2.102 LIÉ À LA MEMBRANE PAR UN LIEN GPI

Le peptide signal nécessaire à l'expression dans un système eucaryote a été ajouté à la construction du sc2.102, composée dans l'ordre de  $V\alpha 1$ , d'une charnière, de  $V\beta 4$  et de  $C\beta 1$  contenant un marqueur  $H_6$ . De plus, la séquence nommée PLAP, provenant de l'alcaline phosphatase de placenta humain, a été ajoutée en C-terminal de la séquence du sc2.102 afin de permettre, lors du passage dans le réticulum endoplasmique, le transfert de la protéine sur un lien GPI (**Figure 16**). Ce lien permet l'expression en surface tout en étant clivable par une enzyme, la PI-PLC. Le sc2.102 peut donc être récupéré dans une phase soluble. La construction a été faite dans le vecteur pcDNA3.1 qui permet une expression constitutive sous le contrôle du promoteur CMV.



**Figure 15. Immunoprécipitation de NusA.** Les bactéries BL21Trx(DE3) ont été transformées avec le vecteur sc2.102/pET-43b et pET-43b et l'expression induite avec 1mM d'IPTG pendant 6 heures à 22°C. Les protéines ont été séparées en fraction soluble (s) et insoluble suite à un traitement au Triton X-100, au lysozyme et aux ultrasons. Les protéines retrouvées dans les fractions solubles ont été clivées à la thrombine (sc). La protéine NusA a été ensuite adsorbée à des billes couplées à la S-protéine (b) et le sc2.102 retrouvé dans le surnageant (scp) a été récupéré. La présence du sc2.102 et de NusA a été révélée par chimiluminescence d'une immunoempreinte de type Western incubée avec l'anticorps anti-polyhistidine (dilution 1/1000) et l'anticorps anti-IgG couplé à la peroxydase du raifort (dilution 1/4000).



**Figure 16. Organisation de la séquence du sc2.102 en fusion avec une séquence permettant le transfert d'un lien GPI.** La séquence codant pour le sc2.102 est composée du peptide signal, de la région V $\alpha$ 4, d'une charnière (motif G<sub>4</sub>S répété 3 fois), de la région V $\beta$ 1, de la région C $\beta$ 1 contenant un marqueur H<sub>6</sub> et d'une séquence permettant le transfert d'un lien GPI lors de l'expression.

### 3.4.1 Expression transitoire

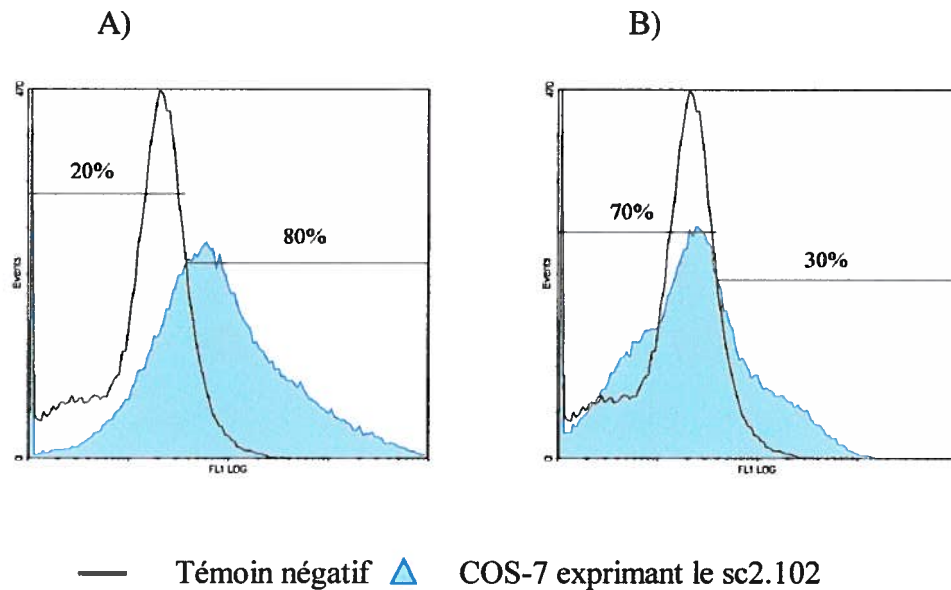
Afin de vérifier si le vecteur sc2.102PLAP/pcDNA3.1 permettait l'expression du sc2.102, les cellules COS-7 ont été transfectées et les cellules récupérées après 24 heures. Les cellules COS-7, qui exprime l'antigène T du virus SV40, permettent une forte expression du sc2.102 suite à la réplication multi-épissomale du plasmide sc2.102PLAP/pcDNA3.1, qui contient l'origine de réplication de SV40. La présence du sc2.102 à la surface des cellules a été détectée à l'aide d'un marquage en cytométrie en flux.

On remarque à la **Figure 17A** que 80% de la population exprime une protéine qui est reconnue par l'anticorps anti-polyhistidine et à la **Figure 17B** que 30% exprime une protéine qui est reconnue par l'anticorps anti-chaîne  $\beta$  de TCR.

La construction permet donc l'expression du sc2.102 en surface de la cellule. De plus, le sc2.102 semble être dans une bonne conformation puisque l'anticorps anti-chaîne  $\beta$  de TCR est connu pour reconnaître uniquement les hétérodimères de TCR exprimés à la surface des cellules, donc un épitope conformationnel (Kubo *et al.*, 1989).

### 3.4.2 Expression à long terme (stable)

Afin d'obtenir une lignée cellulaire qui exprime le sc2.102, les cellules CHO-KI ont été transfectées de façon stable avec le vecteur sc2.102PLAP/pcDNA3. Un sous-clone a été sélectionné, identifié par marquage en cytométrie en flux, pour sa forte expression du sc2.102. Les cellules CHO-KI ont été utilisées puisque les cellules Cos-7, avec l'expression de l'antigène T, ne survivent qu'un certain temps en présence d'un plasmide contenant l'origine de réplication SV40. De plus ces cellules n'expriment aucune chaîne de TCR ni du complexe CD3 ce qui simplifie les marquages en cytométrie en flux en étant assuré d'un marquage spécifique. La présence du sc2.102 à la surface des cellules a été détectée de la même façon que lors de l'expression transitoire à l'exception que seulement l'anticorps anti-polyhistidine a été utilisé. La détection du sc2.102 a été



**Figure 17. Expression transitoire du sc2.102PLAP.** Les cellules COS-7 ont été transfectées avec le vecteur sc2.102PLAP/pcDNA3.1 à la Lipofectamine 2000 et les cellules ont été récupérées après 24 heures. La présence du sc2.102 à la surface des cellules a été détectée à l'aide d'un marquage en cytométrie en flux utilisant soit A) l'anticorps anti-polyhistidine (dilution 1/200) suivi de l'anticorps anti-IgG-FITC (dilution 1/200) où le témoin négatif (isotypique) utilisé est l'anticorps 14.4.4 (dilution 1/200) en remplacement de l'anticorps anti-polyhistidine, soit B) l'anticorps anti-chaîne  $\beta$  biotinylé de TCR (dilution 1/100) suivi de la streptavidine-FITC (dilution 1/200) où le témoin négatif est un marquage sans l'anticorps anti-TCR $\beta$ .



faite à différents temps après la sélection d'un clone stable (jour 1) et a permis de vérifier la stabilité de l'expression.

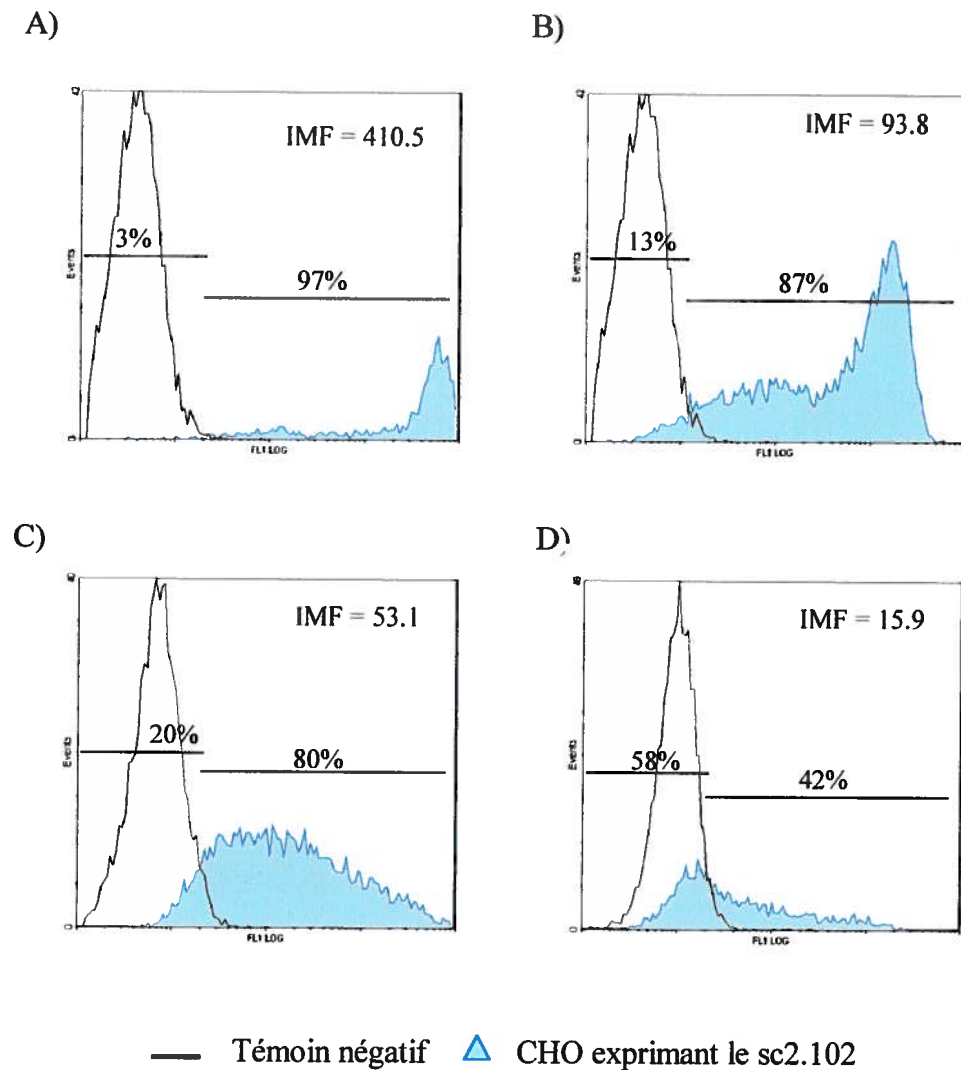
La **figure 18A** montre le profil de cytométrie obtenue suite au marquage du clone de cellule CHO-KI exprimant le sc2.102 au jour 1. On peut y remarquer que le pic de population est défini autour de la troisième décade et que l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) est de 410.5. On observe ensuite au fil du temps, à la **Figure 18B,C** et **D**, une diminution constante de l'intensité moyenne de fluorescence ainsi que l'hétérogénéité croissante de l'expression du sc2.102 par la population ce qui signifie qu'il y a perte d'expression du sc2.102. Il y a donc expression du sc2.102 à la surface des cellules CHO-KI mais elle n'est pas stable.

### 3.5 PURIFICATION DU SC2.102 LIÉ À LA MEMBRANE PAR UN LIEN GPI

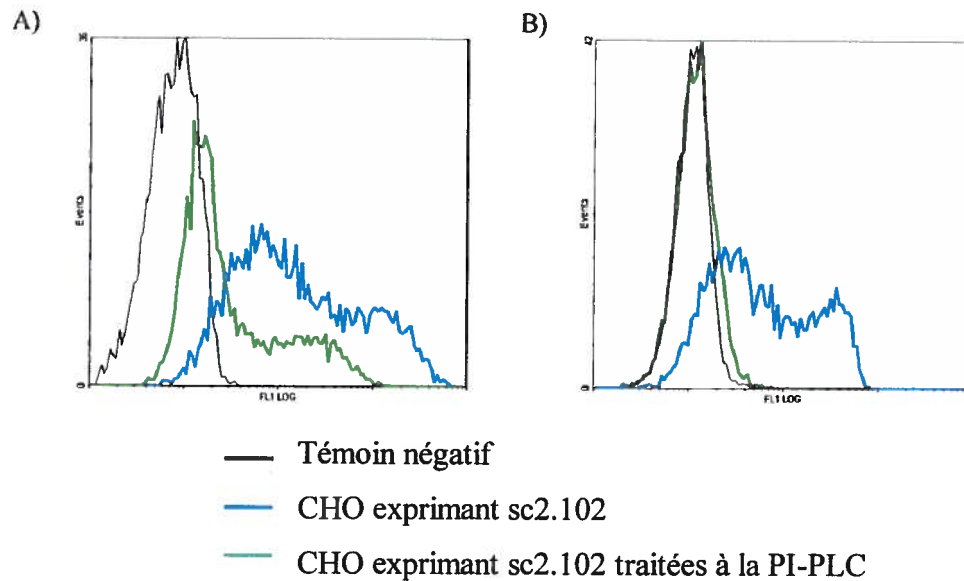
#### 3.5.1 Clivage du sc2.102 de la membrane

Les expérimentations ont été effectuées avec les cellules CHO-KI exprimant le sc2.102PLAP, maintenues en culture entre 9 et 40 jours après la sélection d'un sous-clone. Les cellules ont été traitées avec la PI-PLC afin de vérifier s'il était possible de cliver la protéine de la surface de la cellule. L'absence du sc2.102, à la surface des cellules après clivage, a été vérifiée à l'aide d'un marquage en cytométrie en flux.

On observe suite au marquage avec l'anti-polyhistidine, à la **Figure 19A**, qu'il y a perte d'expression en surface du sc.2012 après un traitement à la PI-PLC. La perte d'expression est aussi confirmée suite au marquage avec l'anti-chaîne  $\beta$  de TCR à la **Figure 19B**. On peut par contre constater que la perte d'expression n'est pas totale avec le marquage à l'anti-polyhistidine. Plusieurs conditions de clivage ont été testées et les résultats présentés sont ceux qui ont permis un maximum de molécules clivées. Ces résultats suggèrent donc que certains sc2.102 seraient exprimés à la surface des cellules mais qu'il serait impossible de les cliver avec la thrombine et également impossible de les détecter avec l'anticorps anti-chaîne  $\beta$  de TCR, qui reconnaît un épitope conformationnel.



**Figure 18. Instabilité d'expression du sc2.102PLAP dans le temps.** Les cellules CHO-KI ont été transfectées de façon stable avec le vecteur sc2.102PLAP/pcDNA3.1 à la Lipofectamine 2000. Suite à la sélection d'un clone, la présence du sc2.102 à la surface des cellules a été détectée à l'aide d'un marquage en cytométrie en flux utilisant l'anticorps anti-polyhistidine (dilution 1/200) suivi de l'anticorps anti-IgG-FITC (dilution 1/200) où le témoin négatif (isotypique) utilisé est l'anticorps 14.4.4 (dilution 1/200) en remplacement de l'anticorps anti-polyhistidine au jour 1 (A) au jour 9 (B), au jour 41 (C) et au jour 86 (D).



**Figure 19. Clivage du sc2.102 de la surface cellulaire.** Les cellules CHO-KI exprimant le sc2.102 ( $220 \times 10^6$  cellules) ont été traitées avec 5 U de la PI-PLC. La présence du sc2.102 à la surface des cellules a été détectée à l'aide d'un marquage en cytométrie en flux utilisant soit A) l'anticorps anti-polyhistidine (dilution 1/200) suivi de l'anticorps anti-IgG-FITC (dilution 1/200) où le témoin négatif a été un témoin isotypique soit l'anticorps 14.4.4 (dilution 1/200), soit B) l'anticorps anti-chaîne  $\beta$  de TCR (dilution 1/100) suivi de la streptavidine-FITC (dilution 1/200) où le témoin négatif a été un marquage sans premier anticorps.

Une certaine proportion des sc2.102 exprimés à la surface des cellules l'est donc par un lien GPI puisqu'il est possible de cliver ce lien avec la PI-PLC.

### 3.5.2 Purification du sc2.102 par chromatographie

Le sc2.102 présent dans le surnageant obtenu suite au clivage à la PI-PLC a été purifié par chromatographie d'affinité par chélation de métal. C'est le marqueur de 6 histidines (H<sub>6</sub>) qui a chélaté le nickel et a permis au sc2.102 d'être retenu sur la colonne.

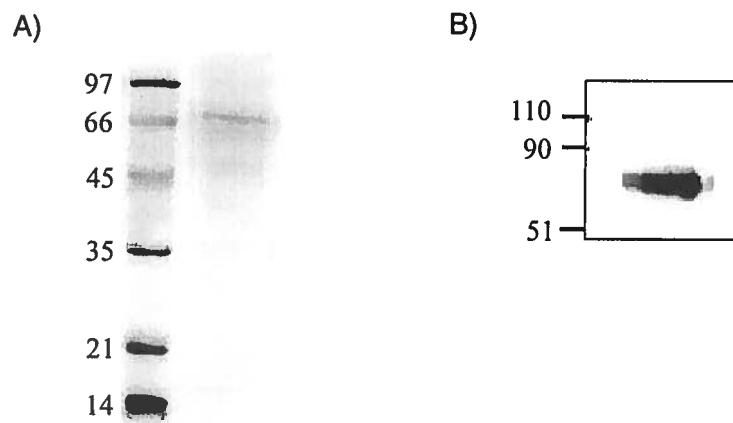
La purification a permis de récolter, avec  $220 \times 10^6$  cellules, 540  $\mu\text{g}$  de protéine, déterminée par dosage aux U.V. et colorimétrique. Il est possible d'identifier sur le gel SDS-PAGE, à la **Figure 20A**, la présence d'une seule bande importante à environ 65 kDa. Cette masse est par contre supérieure aux 45 kDa attendue. Il est important de noter qu'une partie du lien GPI était toujours rattachée à la protéine et qu'il a pu influencer la migration dans le gel. L'immunoempreinte vient confirmer l'appartenance de la bande au sc2.102. La présence d'une seule bande prouve également que le produit de purification est pur (**Figure 20B**).

## 3.6 CARACTÉRISATION DU SC2.102 PRODUIT

Suite à la production et à la purification du sc2.102, il restait à vérifier s'il était actif biologiquement. Les tests visaient à vérifier si le sc2.102 était en mesure de reconnaître ses ligands, le complexe Hb(64-76)/I-E<sup>K</sup> et le complexe EPM/I-E<sup>P</sup>.

### 3.6.1 Reconnaissance en cytométrie en flux

Ce test a permis d'utiliser le sc2.102 comme un anticorps i.e de vérifier s'il était apte à se fixer sur des ligands présents à la surface d'une cellule. Les cellules CH27 E<sup>P</sup>-EPM et CH27 mHEL-Hb, qui expriment respectivement de façon constitutive les ligands EPM/I-E<sup>P</sup> et Hb(64-76)/I-E<sup>K</sup>, ont été utilisées comme cellules présentatrices. Un complexe sc2.102-Ac ou un complexe sc2.102-billes de polystyrène a été créé afin de



**Figure 20. Purification du sc2.102 par chromatographie d'affinité.** Le sc2.102 a été obtenu suite au clivage de  $220 \times 10^6$  cellules CHO-KI exprimant celui-ci à l'aide de 5U de PI-PLC. Le sc2.102 a été purifié par chromatographie d'affinité par chélation du nickel, dilué avec du PBS 1X et concentré à un volume de 1ml par ultrafiltration. Une quantité de  $10 \mu\text{g}$  de protéine a été utilisée pour réaliser A) un SDS-PAGE coloré au bleu brillant de coomassie et B) une immunoempreinte de type Western révélée par chimiluminescence suite à une incubation avec l'anticorps anti-polyhistidine (dilution 1/1000) et l'anticorps anti-IgG couplé à la peroxydase du raifort (dilution 1/4000).

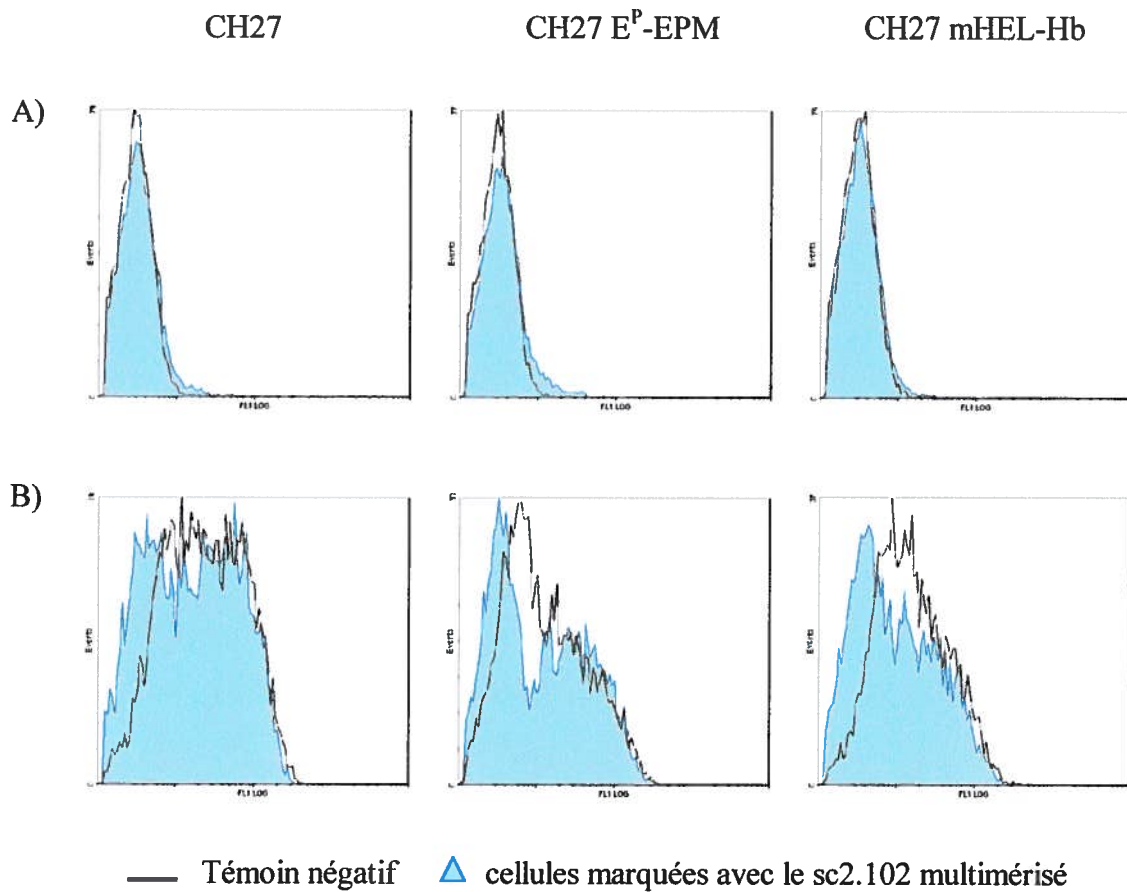
multimériser le sc2.102 pour augmenter la stabilité et la sensibilité du marquage. L'utilisation de l'anti-CD16/32 a permis de bloquer les récepteurs Fc et ainsi diminuer le bruit de fond. Suite à des mises au point, les quantités de complexe utilisées correspondent à un signal maximal avec un bruit de fond minimal.

Lorsque l'on examine la **Figure 21**, on ne distingue aucune différence entre les cellules présentatrices de ligands et le témoin et ce avec les deux types de complexes de sc2.102 utilisés. Avec le complexe sc2.102-billes de polystyrène, **Figure 21B**, on remarque que les populations ne sont pas homogènes et que les cellules analysées avec ce complexe ont été moins marquées que celles analysées avec les billes témoins seulement. Cette particularité est probablement due au fait que le témoin négatif n'était pas associé à un autre TCR puisque aucun autre TCR soluble n'était disponible au laboratoire. Les anticorps anti-chaîne $\beta$  de TCR étaient alors davantage disponible pour une fixation non spécifique.

Il n'a pas été possible de démontrer une réaction spécifique du sc2.102 soluble, lorsque celui-ci était multimérisé avec des anticorps, avec des ligands présentés par des cellules dans le cadre d'un marquage en cytométrie en flux. Il est par contre difficile de juger de l'efficacité de la multimérisation avec des billes de polystyrène puisqu'il a été impossible d'obtenir un vrai témoin négatif.

### **3.6.2 Compétition d'activation d'hybridome T 2.102**

Un test de compétition avec l'hybridome T 2.102 a été réalisé en présence du sc2.102 purifié. Ce test a permis d'évaluer si le sc2.102 reconnaissait suffisamment ses ligands pour qu'en s'y liant, il empêche l'accès de ceux-ci à l'hybridome T 2.102. L'hybridome T bloqué, celui-ci ne peut être activé et donc ne produit pas d'IL-2. Un blocage des ligands résulte donc en une diminution de production de l'IL-2 et par le fait même en une diminution de la croissance des CTLL-2. C'est cette diminution de croissance qui est observable dans le test par l'entremise de l'incorporation de thymidine radiomarquée.



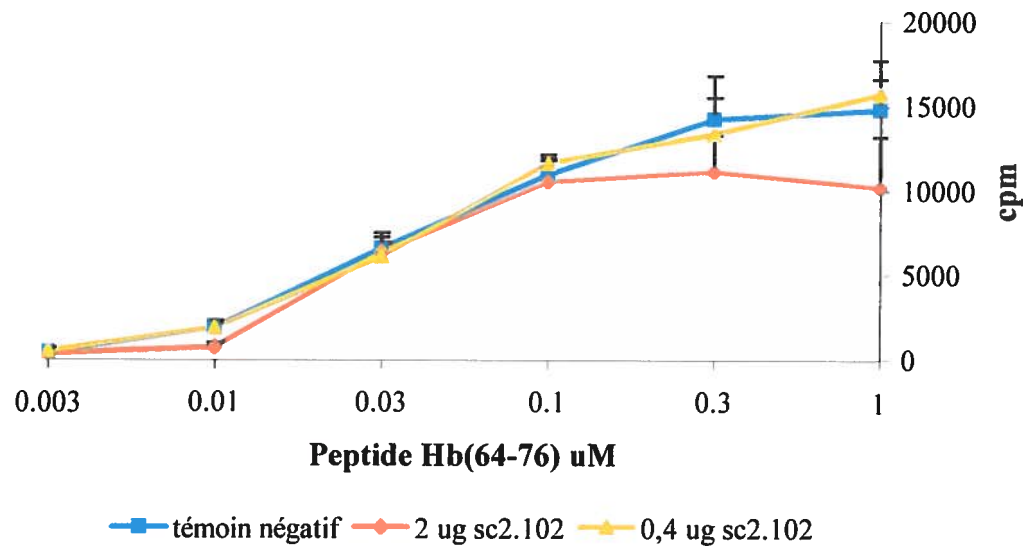
**Figure 21. Analyse de la réactivité du sc2.102 soluble par cytométrie en flux.** Les récepteurs Fc des cellules CH27 (témoin), CH27 E<sup>P</sup>-EPM et CH27 mHEL-Hb ont été bloqués avec l'anticorps l'anti-CD16/32 dilué 1/100. Ensuite, un complexe A) sc2.102-Ac, formé de 10 µg de sc2.102 purifié, de 0,5 µg de l'anti-chaîne β de TCR et de 0,25 µg de la streptavidine ou un complexe B) sc2.102-billes, formé de 7 µg de sc2.102 purifié, de 0,25 µg de l'anti-chaîne β de TCR et de 10 µg billes avidine couplées à une fluorescence jaune, ont été utilisés pour le marquage des cellules. Les témoins négatifs ont été réalisés avec des complexes formés sans le sc2.102.

Le test a été réalisé avec les cellules CH27 qui ont été chargées avec le peptide Hb(64-76). Le sc2.102 a ensuite été ajouté simultanément avec l'hybridome T 2.102 aux cellules CH27 chargées du peptide. Après une incubation de 24 heures, le surnageant a été utilisé comme supplément d'IL-2 pour les cellules CTLL-2 et leur croissance mesurée par incorporation de thymidine radioactive. L'expérience présentée n'a pu être réalisée qu'une seule fois en raison du manque de sc2.102.

Il semble que 2  $\mu\text{g}$  de sc2.102 par puits ait une petite influence sur l'hybridome T 2.102. En effet lorsque l'on observe la **Figure 22**, on remarque une diminution de moitié du compte de radioactivité pour une concentration de 0,01  $\mu\text{M}$  de peptide soit de 1866 (+/-400)  $\mu\text{Ci}$  pour le témoin négatif à 760 (+/-226)  $\mu\text{Ci}$  pour 2  $\mu\text{g}$  de sc2.102. De plus, on remarque l'apparition d'un plateau à une concentration en peptide de 0.1  $\mu\text{M}$ . Le plateau se situe à des comptes de radioactivité moins élevés que le témoin négatif. Cette diminution est par contre difficile à interpréter puisque l'écart type est très important pour ces valeurs. Il aurait évidemment été intéressant de comparer l'effet avec des quantités plus importantes de sc2.102 mais celui-ci n'était pas disponible en quantité suffisante.

Le sc2.102 pourrait affecter l'activation de l'hybridome T 2.102 en reconnaissant les complexes Hb(64-76)/I-E<sup>k</sup> présentés par les cellules CH27 mais des tests supplémentaires devraient être effectués avant de tirer une conclusion définitive.





**Figure 22. Test de compétition d'activation d'hybridome T2.102.** Les cellules présentatrices d'antigène CH27 chargées avec différente concentration du peptide Hb(64-76) ont été mises en présence de l'hybridome T 2.102 (G2.B9) et du sc2.102 purifié à 2  $\mu$ g par puits ou à 0,4  $\mu$ g par puits pendant environ 24 heures. Le surnageant a ensuite été utilisé comme source d'IL-2 lors de la croissance des cellules CTLL-2. Leur prolifération a été mesurée en cpm suite à l'ajout de  $^3\text{H}$ -thymidine dans le milieu. Un témoin négatif a été réalisé en absence du sc2.102 mais en présence de son tampon.

## **4 DISCUSSION**

Les informations disponibles à ce jour sur les récepteurs de cellule T ne répondent qu'à une partie des interrogations de la communauté scientifique. Chaque nouveau TCR étudié apporte de précieux renseignements. L'obtention du TCR 2.102 sous une forme soluble pourrait permettre une meilleure compréhension des interactions d'un TCR alloréactif avec ses ligands en déterminant par exemple l'affinité avec le ligand, la vitesse d'association et de dissociation. La cristallographie du sc2.102 en complexe avec ses ligands permettrait pour sa part de confirmer plusieurs hypothèses ainsi que de répondre à d'autres questions comme confirmer l'implication du CDR3 et des autres portions du TCR et du complexe pCMH, déterminer l'orientation du TCR par rapport au CMH, les résidus du peptide qui entrent directement en contact avec le TCR. Toutes ces informations conduiraient à établir de façon claire les différences et similitudes entre l'alloligand et le ligand du TCR 2.102 et peut-être aussi améliorer les connaissances générales sur l'alloréactivité. De plus, une meilleure connaissance du récepteur définirait de manière plus fine le modèle d'alloréactivité basé sur la cellule T 2.102. Il pourrait également être possible de produire un anticorps clonotypique au TCR 2.102 à l'aide du TCR sous une forme soluble, peaufinant d'avantage le modèle.

L'obtention du récepteur de la cellule T 2.102 dans une forme soluble était l'objectif principal de ce projet. Comme il n'existe pas de stratégie efficace pour la production de TCR s'appliquant à tous les récepteurs, il a fallu en choisir certaines dans la panoplie déjà utilisée et les combinaisons possible entre celles-ci. L'utilisation d'un TCR sous la forme d'une chaîne unique a été choisie puisque qu'elle présageait l'obtention d'un site de reconnaissance fonctionnel tout en évitant les problèmes de pairage régulièrement rencontrer lors de la production de TCR (Chung *et al.*, 1994; Plaksin *et al.*, 1997).

#### 4.1 EXPRESSION CHEZ *E. COLI*

L'expression chez *E. coli* a été choisit puisqu'il s'agit d'un système d'expression efficace, peu dispendieux et qui avait déjà été utilisé avec succès dans la production de TCR (§ 1.4). La fusion d'une protéine soluble en C-terminal avait pour but d'augmenter

la solubilité de la protéine de fusion et donc du TCR 2.102. Deux protéines, la thiorédoxineA ainsi que NusA, ont été utilisées puisqu'il avait été démontré qu'elles augmentaient la solubilité d'une protéine lorsqu'elles étaient exprimées en fusion avec celle-ci (Harrison Roger G, 2000; LaVallie *et al.*, 1993).

Il est évident que la fusion du sc2.102 avec la thiorédoxineA n'a pas eu les résultats escomptés. En effet, le sc2.102 n'a pas été obtenu dans la fraction soluble (**Figure 12**), alors qu'il s'agissait de l'objectif principal du projet. Il est possible d'invoquer la petite taille de la protéine relativement à celle du sc2.102 comme cause de l'échec. L'hypothèse de la taille de la protéine fusionnée comme facteur influençant la solubilité de la protéine de fusion, a été partiellement confirmée avec la fusion à NusA. Suite à la fusion du sc2.102 avec cette protéine de taille plus importante, il a été possible de retrouver la protéine de fusion dans la fraction soluble.

La fusion avec la protéine NusA a permis de retrouver le sc2.102 dans la fraction soluble par contre, il a été impossible de le purifier. Suite au clivage du sc2.102 de NusA, il a été impossible de confirmer sa présence dans la solution de protéine. Beaucoup de temps et d'efforts ont été investis pour tenter de trouver des réponses. Premièrement, il avait déjà été vérifié qu'aucun site de clivage de la thrombine, dont la séquence est LVPA/GS, ne se retrouvait dans la séquence en a.a. du sc2.102. De plus, différents temps de clivage et différentes quantités d'unité d'enzyme (résultats non montrés) ont été testées afin d'éviter une protéolyse à des sites secondaires. Même dans les conditions minimales de clivage, les bandes non prévues apparaissaient. Il y a peut-être eu des problèmes au niveau même de la protéine NusA ou du vecteur puisque des bandes supplémentaires sont apparues lors du clivage des protéines produites suite à l'expression du vecteur original, en absence de la séquence du sc2.102 (**Figure 14**). Un test a également été effectué (résultat non présenté) avec l'autre site de clivage disponible dans le vecteur, qui était celui de l'entérokinase, et des résultats semblables ont été obtenus. Plusieurs bandes non attendues sont apparues suite au clivage. D'autres souches d'expression ont aussi été utilisées (résultats non montrés) afin de vérifier si le problème provenait de la souche utilisée, mais aucun changement n'a été noté. Comme il en a été mentionné dans la section

des résultats, il se pourrait que ces bandes proviennent du clivage des bandes de dégradations observées lors de la production.

Un autre obstacle à la détection du sc2.102 produit en fusion avec NusA était la sensibilité de la S-protéine. Cette protéine devait permettre la reconnaissance d'un marqueur sur NusA et ainsi la discriminer avec le sc2.102. La dilution recommandée est de 1 : 10 000 pour une immunoempreinte de type Western alors que j'ai du utiliser une dilution de 1 : 1000. Était-ce du au lot de production ou bien était-ce seulement la capacité de la protéine à reconnaître le marqueur qui explique ce grand écart? Probablement que l'utilisation d'un marqueur spécifique au sc2.102 pourrait discriminer plus facilement le sc2.102 de NusA comme par exemple l'ajout de l'épitope reconnu par l'anticorps anti-HA ou l'anticorps anti-c-myc.

L'expression du sc2.102 en fusion avec la protéine NusA semblait au départ être prometteuse mais plusieurs problèmes non résolus ont miné cette approche. De plus, cette approche a été menée de front avec le système utilisant les cellules de mammifère et puisque celui-ci a donné de meilleurs résultats, l'utilisation de *E. coli* a été abandonnée.

#### 4.2 EXPRESSION AVEC UN LIEN GPI

L'utilisation de cellules de mammifère comme système d'expression se voulait une alternative à celui de *E. coli*. C'était un système qui nous était plus familier que celui des cellules d'insectes et qui avait réussi dans le passé à permettre la production de TCR (§ 1.4). L'expression à la surface de la cellule permettait une validation rapide de l'expression du TCR et l'utilisation du lien GPI permettait un clivage efficace sans danger pour le TCR, le site reconnu par l'enzyme n'étant pas présent dans le TCR.

L'expression du sc2.102 avec un lien GPI clivable à la surface de cellules de mammifères est une approche qui a bien réussi mais qui doit être améliorée. Un problème important de stabilité d'expression a été détecté (**Figure 18**) et il serait

important de régler ce problème pour permettre de plus haut niveau d'expression et donc de meilleurs rendements.

La principale raison de cette perte d'expression est probablement le fait que le lien GPI ne soit pas surexprimé et qu'il est aussi utilisé pour plusieurs enzymes dont la p57(KIP) (Furuhata *et al.*, 1996), pour des récepteurs comme le récepteur folate (Lacey *et al.*, 1989) ainsi que pour plusieurs autres types de molécules tel certains LERKs (Cerretti *et al.*, 1996) et la MMP-17 (Itoh *et al.*, 1999). En effet, l'ancre GPI ne provient pas de l'expression du vecteur sc2.102PLAP/pcDNA3.1. L'ancre GPI se retrouve à la lumière du RE. L'ancre préformée est composée de deux chaînes acyle grasses et de divers sucres comme l'inositol, le N-acétylglucosamine, le mannose et se termine par un groupement éthanolamine. Les protéines se retrouvent aussi à la lumière du RE mais elles sont ancrées dans la membrane par une région transmembranaire. Une séquence de cette région, qui déborde dans la lumière du RE, est reconnue par un complexe enzymatique comme signal pour une transpeptidation du groupement éthanolamine de l'ancre GPI au carboxyle terminal du dernier résidu conservé de la protéine. Donc en plus de l'ancre GPI, il y a aussi le complexe transamidase impliquée dans la transpeptidation qui n'est pas surexprimé dans la cellule. Ces deux facteurs tendent probablement à obliger la cellule à favoriser l'utilisation de ces ressources limitées pour ses propres protéines afin de survivre ou encore, favorise la sélection des cellules qui expriment des niveaux plus faibles de sc2.102. Cette propriété pourrait également expliquer la présence de sc2.102 non clivable à la surface des cellules lors des tests réalisés (**Figure 19**). Cette fraction de sc2.102 exprimés sans le lien GPI n'est pas mise en évidence suite à un marquage avec l'anticorps anti-chaîne  $\beta$  de TCR, anticorps conformationnel. Ceci suggère que le sc2.102, suite à son expression par cette approche, doit être transférée sur un lien GPI pour être bien repliée.

Un moyen simple de contourner le problème de perte d'expression serait d'utiliser un système d'expression inductible comme par exemple le système tétracycline(Gossen et Bujard, 1992). Il serait alors possible de produire de grande quantité de cellules viables et ensuite d'induire l'expression du sc2.102 avec un lien GPI en utilisant toutes les

ressources de la cellule à cette fin. L'approche serait grandement facilitée par l'utilisation de cellules en suspension comparativement à des cellules adhérentes comme ce fut le cas lors de ce projet. L'utilisation de cellules en suspension permet de produire de grande quantité de cellules plus rapidement et avec une logistique plus simple.

En changeant le système d'expression pour un système plus performant il serait également intéressant de rentabiliser le clivage à la PI-PLC. Particulièrement, si le projet est poursuivi et utilisé à plus grande échelle. La PI-PLC commerciale est une enzyme dispendieuse, il serait donc important de considérer sa production en laboratoire. Le protocole de production et de purification de l'enzyme est déjà établi (Low *et al.*, 1988) alors il serait facile de mettre en application une telle mesure. Il est certain qu'une période d'adaptation serait nécessaire mais les économies pourraient être très importantes.

### 4.3 TESTS D'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

Dû à la perte d'expression, il a été difficile d'obtenir de grande quantité de sc2.102. Seulement trois productions ont pu être réalisées, faute de temps, avec une moyenne de 500 µg de sc2.102 produit. Les deux premières productions ont servi à la mise au point des analyses en cytométrie ainsi que du test de compétition avec l'hybridome T 2.102. Le manque de matériel a été un grand facteur limitant dans l'exécution des tests, tant en cytométrie qu'avec le test physiologique.

Les analyses réalisées en cytométrie n'ont pas donné les résultats escomptés. Il a été difficile de réaliser tous les tests voulus avec le peu de matériel disponible. Des essais ont d'abord été fait avec le TCR monomérique, révélé avec l'anti-chaîne β de TCR (résultats non montrés), mais sans résultat concluant. L'utilisation du sc2.102 multimérisé s'est avérée une solution pour tenter d'augmenter la sensibilité du marquage et la stabilité d'une liaison potentielle du sc2.102 avec ses ligands. Le principal désavantage de la multimérisation avec un anticorps est que l'on ne peut se débarrasser des molécules non liées. Il demeure donc dans la solution du sc2.102 monomérique en

mesure de se lier à la cellule et de faire compétition avec le sc2.102 multimérisé. Il est évident qu'une telle situation vient diminuer les chances de voir une réponse positive. L'utilisation des billes avait comme objectif d'éliminer la problématique du sc2.102 non lié ainsi que d'augmenter l'avidité de liaison, propriété déjà démontré avec d'autres molécules (Viola et Lanzavecchia, 1999). Cette technique a été utilisée uniquement avec la dernière production alors il a été difficile de faire une bonne mise au point avec le matériel disponible à partager dans les différents tests. Le bruit de fond observé avec les billes couplées au sc2.102 était inférieur à celui observé avec les billes témoins (**Figure 21B**). L'emploi d'un scTCR n'ayant aucune affinité pour les ligands du sc2.102 aurait été un témoin idéal mais aucun n'était disponible au laboratoire. L'interaction non-spécifique de l'anticorps fixé aux billes semble être l'origine du problème. Peut être que l'utilisation d'un autre complexe anticorps/ligand aurait été un meilleur témoin négatif, où l'anticorps aurait été un témoin isotypique. De plus, par manque de matériel, il a été impossible d'optimiser le ratio billes-anticorps-sc2.102. Cette approche devrait donc être développée d'avantage avec un système de production plus performant. Par contre il est possible que la création d'un multimère de sc2.102 avec l'anticorps anti-chaîne  $\beta$ , avant la liaison avec le complexe pCMH, ait bloqué le site de liaison. Le blocage pourrait être le résultat du pontage avec l'anticorps ou d'un encombrement stérique. Toute interaction entre le sc2.102 et son ligand serait alors impossible. Il serait alors intéressant d'utiliser une alternative qui n'utilise pas d'anticorps pour multimériser le sc2.102. La biotinylation directe du sc2.102 après purification suivit d'une multimérisation avec la streptavidine est une option qui pourrait être envisagée.

Le test de compétition d'activation de l'hybridome T 2.102 a permis de caractériser le sc2.102 dans un aspect plus physiologique. Les résultats semblent indiquer une inhibition de l'activation de l'hybridome mais comme mentionné précédemment, des essais avec des quantités plus importantes de sc2.102 seraient à faire afin de confirmer le potentiel d'inhibition du sc2.102. Ce n'est qu'avec un système d'expression plus performant que de tels tests peuvent être réalisés. Il est évident que l'utilisation d'un TCR non spécifique aux complexes Hb(64-76)/I-E<sup>k</sup> comme témoin négatif aurait été idéal mais aucun n'était disponible. L'ajout de protéines autres que des TCR comme témoin



négatif (la BSA par exemple) pourrait également permettre d'évaluer le blocage non spécifique des ligands du à l'ajout de protéines dans le milieu. Le test aurait également pu être amélioré en réalisant une préincubation du sc2.102 avec les cellules présentatrices. Ceci aurait évité de faire une compétition directe et aurait permis au sc2.102 de se lier aux complexes pCMH avant l'hybridome T 2.102 et donc de limiter l'obstruction des ligands par encombrement du à la grosseur de l'hybridome. Le test ne visait pas à déterminer la capacité directe de compétition du sc2.102 sur l'hybridome T 2.102 mais il s'agissait plutôt d'une voie détournée pour identifier si le sc2.102 était en mesure de se lier à son ligand Hb(64-76)/I-E<sup>k</sup>..

Il aurait également été possible de vérifier l'activité biologique du sc2.102 par un système beaucoup plus sensible, la résonance à surface de plasmon. Cette méthodologie permet de mesurer l'affinité de liaison ainsi que sa cinétique. Ce type d'analyse est envisageable puisque des ligands dans une forme soluble ont déjà été produits au laboratoire. Par contre, cette technique nécessite la production d'une plus grande quantité de matériel (sc2.102).

Avec un système de production plus performant il serait important de vérifier la stabilité du sc2.102 dans le temps. Les différents tests réalisés durant le projet n'ont pas toujours pu être faits avec des préparations fraîches. Peut-être qu'une durée prolongée de conservation du sc2.102 a pu influencer les résultats. Les tests devraient être faits avec des préparations de moins de 24 heures et ensuite avec des préparations plus vieilles et comparer pour évaluer la stabilité du sc2.102.

## **Conclusion**

À ce jour il n'existe que très peu de TCR et de complexes TCR/pCMH cristallographiés. La principale difficulté rencontrée est l'obtention sous une forme soluble du récepteur. Le présent projet visait la production du récepteur de la cellule T 2.102 sous une forme soluble afin d'améliorer les connaissances sur le sujet et de raffiner le modèle d'étude de rejet de greffe basé sur la cellule T 2.102.

Des trois approches utilisées, deux ont permis d'obtenir le sc2.102 sous une forme soluble mais une seule a permis de le purifier. Plusieurs autres approches auraient pu être tenté, il n'existe pas de méthode qui fonctionne pour tous les TCR. Pour chaque TCR, il faut travailler en essais et erreurs et dans le cas présent, trois essais ont été nécessaires. C'est l'expression avec un lien GPI sur la membrane de cellules de mammifères qui a été la plus fructueuse comparativement à l'expression en fusion avec deux protéines chez *E. coli*. Par contre, même si l'approche a fonctionnée, elle devrait être améliorée ce qui implique entre autres l'utilisation d'un nouveau vecteur d'expression. Les problèmes de stabilité rencontrés lors de l'expression pourraient être résolus en utilisant un système d'expression inductible au lieu d'un système constitutif. Il est clair que la production de TCR soluble n'est pas une tâche facile et qu'il faut persévérer à essayer plusieurs méthodes.

Nous avons démontré que l'expression du TCR 2.102 sous la forme d'une chaîne unique soluble est possible en utilisant un système impliquant un lien GPI. Il a par contre été impossible de démontrer que le sc2.102 produit était biologiquement actif. Les résultats obtenus avec le test de compétition d'activation sont toutefois prometteurs. Des travaux supplémentaires devraient être réalisés avec un système d'expression plus performant afin de poursuivre la caractérisation. Ce n'est qu'après avoir confirmé l'activité biologique du sc2.102 que nous pourrons l'utiliser à d'autres fins tel que l'étude de sa structure ou de sa liaison aux différents ligands.

## Bibliographie

- Akira, S., K. Okazaki et H. Sakano. 1987. Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science* 238: 1134-1138.
- Alberola-Ila, J., K. A. Hogquist, K. A. Swan, M. J. Bevan et R. M. Perlmutter. 1996. Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* 184: 9-18.
- Allison, J. P., B. W. McIntyre et D. Bloch. 1982. Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. *J Immunol* 129: 2293-2300.
- Amzel, L. M. et R. J. Poljak. 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu Rev Biochem* 48: 961-997.
- Anderson, G., B. C. Harman, K. J. Hare et E. J. Jenkinson. 2000. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin Immunol* 12: 457-464.
- Benoist, C. et D. Mathis. 1992. Generation of the alpha beta T-cell repertoire. *Curr Opin Immunol* 4: 156-161.
- Berg, L. J. et J. Kang. 2001. Molecular determinants of TCR expression and selection. *Curr Opin Immunol* 13: 232-241.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger et D. C. Wiley. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518.
- Bodmer, J. G., S. G. Marsh, E. D. Albert, W. F. Bodmer, R. E. Bontrop, D. Charron, B. Dupont, H. A. Erlich, R. Fauchet, B. Mach, W. R. Mayr, P. Parham, T. Sasazuki, G. M. Schreuder, J. L. Strominger, A. Svejgaard et P. I. Terasaki. 1997. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Vox Sang* 73: 105-130.
- Borgulya, P., H. Kishi, Y. Uematsu et H. von Boehmer. 1992. Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles. *Cell* 69: 529-537.
- Bromley, S. K., W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen et M. L. Dustin. 2001. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19: 375-396.
- Candeias, S., J. Katz, C. Benoist, D. Mathis et K. Haskins. 1991. Islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice express heterogeneous T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6167-6170.
- Cerretti, D. P., N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, M. U. Kuefer, V. Valentine,

D. N. Shapiro, X. Cui et S. W. Morris. 1996. The gene encoding LERK-7 (EPLG7, Epl7), a ligand for the Eph-related receptor tyrosine kinases, maps to human chromosome 5 at band q21 and to mouse chromosome 17. *Genomics* 35: 376-379.

Champion, S., B. A. Imhof, P. Savagner et J. P. Thiery. 1986. The embryonic thymus produces chemotactic peptides involved in the homing of hemopoietic precursors. *Cell* 44: 781-790.

Chan, S. H., D. Cosgrove, C. Waltzinger, C. Benoist et D. Mathis. 1993. Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell* 73: 225-236.

Chang, H. C., Z. Bao, Y. Yao, A. G. Tse, E. C. Goyarts, M. Madsen, E. Kawasaki, P. P. Brauer, J. C. Sacchettini, S. G. Nathenson et al. 1994. A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11408-11412.

Chung, S., K. W. Wucherpfennig, S. M. Friedman, D. A. Hafler et J. L. Strominger. 1994. Functional three-domain single-chain T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12654-12658.

Corr, M., A. E. Slanetz, L. F. Boyd, M. T. Jelonek, S. Khilko, B. K. al-Ramadi, Y. S. Kim, S. E. Maher, A. L. Bothwell et D. H. Margulies. 1994. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 265: 946-949.

Corthay, A., K. S. Nandakumar et R. Holmdahl. 2001. Evaluation of the percentage of peripheral T cells with two different T cell receptor alpha-chains and of their potential role in autoimmunity. *J Autoimmun* 16: 423-429.

Crump, A. L., M. J. Grusby, L. H. Glimcher et H. Cantor. 1993. Thymocyte development in major histocompatibility complex-deficient mice: evidence for stochastic commitment to the CD4 and CD8 lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10739-10743.

Daniel, C., A. Grakoui et P. M. Allen. 1998a. Inhibition of an in vitro CD4+ T cell alloresponse using altered peptide ligands. *J Immunol* 160: 3244-3250.

Daniel, C., S. Horvath et P. M. Allen. 1998b. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 8: 543-552.

Davies, D. R. et H. Metzger. 1983. Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol* 1: 87-117.

Davis, M. M. 1985. Molecular genetics of the T cell-receptor beta chain. *Annu Rev Immunol* 3: 537-560.

Davis, M. M. 1988. Molecular genetics of T-cell antigen receptors. *Hosp Pract (Off Ed)* 23: 157-164, 169-170.

- Davis, M. M., J. J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden et Y. Chien. 1998. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16: 523-544.
- Degano, M., K. C. Garcia, V. Apostolopoulos, M. G. Rudolph, L. Teyton et I. A. Wilson. 2000. A functional hot spot for antigen recognition in a superagonist TCR/MHC complex. *Immunity* 12: 251-261.
- Delon, J. 2000. The immunological synapse. *Curr Biol* 10: R214.
- Ding, Y. H., B. M. Baker, D. N. Garboczi, W. E. Biddison et D. C. Wiley. 1999. Four A6-TCR/peptide/HLA-A2 structures that generate very different T cell signals are nearly identical. *Immunity* 11: 45-56.
- Ding, Y. H., K. J. Smith, D. N. Garboczi, U. Utz, W. E. Biddison et D. C. Wiley. 1998. Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA- A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity* 8: 403-411.
- Engel, I., T. H. Ottenhoff et R. D. Klausner. 1992. High-efficiency expression and solubilization of functional T cell antigen receptor heterodimers. *Science* 256: 1318-1321.
- Evavold, B. D., S. G. Williams, B. L. Hsu, S. Buus et 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.
- Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, P. Marrack et J. Kappler. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272: 1001-1004.
- Furuhata, T., T. Tokino, T. Urano et Y. Nakamura. 1996. Isolation of a novel GPI-anchored gene specifically regulated by p53; correlation between its expression and anti-cancer drug sensitivity. *Oncogene* 13: 1965-1970.
- Gao, G. F., Z. Rao et J. I. Bell. 2002. Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands. *Trends Immunol* 23: 408-413.
- Garboczi, D. N., P. Ghosh, U. Utz, Q. R. Fan, W. E. Biddison et D. C. Wiley. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384: 134-141.
- Garcia, K. C., M. Degano, R. L. Stanfield, A. Brunmark, M. R. Jackson, P. A. Peterson, L. Teyton et I. A. Wilson. 1996. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274: 209-219.
- Garcia, K. C., M. D. Tallquist, L. R. Pease, A. Brunmark, C. A. Scott, M. Degano, E. A. Stura, P. A. Peterson, I. A. Wilson et L. Teyton. 1997. Alphabeta T cell receptor interactions with syngeneic and allogeneic ligands: affinity measurements and crystallization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13838-13843.

- Garcia, K. C., L. Teyton et I. A. Wilson. 1999. Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 17: 369-397.
- Glusman, G., L. Rowen, I. Lee, C. Boysen, J. C. Roach, A. F. Smit, K. Wang, B. F. Koop et L. Hood. 2001. Comparative genomics of the human and mouse T cell receptor loci. *Immunity* 15: 337-349.
- Golden, A., S. S. Khandekar, M. S. Osburne, E. Kawasaki, E. L. Reinherz et T. H. Grossman. 1997. High-level production of a secreted, heterodimeric alpha beta murine T-cell receptor in *Escherichia coli*. *J Immunol Methods* 206: 163-169.
- Goldrath, A. W., K. A. Hogquist et M. J. Bevan. 1997. CD8 lineage commitment in the absence of CD8. *Immunity* 6: 633-642.
- Gorer, P. A. 1937. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J Pathol Bacteriol* 44: 691-697.
- Gossen, M. et H. Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5547-5551.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen et M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285: 221-227.
- Gregoire, C., N. Rebai, F. Schweisguth, A. Necker, G. Mazza, N. Auphan, A. Millward, A. M. Schmitt-Verhulst et B. Malissen. 1991. Engineered secreted T-cell receptor alpha beta heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8077-8081.
- Groettrup, M. et H. von Boehmer. 1993. A role for a pre-T-cell receptor in T-cell development. *Immunol Today* 14: 610-614.
- Harrison Roger G. 2000. Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein. in *Novations* 11: 4-7.
- Haskins, K., R. Kubo, J. White, M. Pigeon, J. Kappler et P. Marrack. 1983. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. *J Exp Med* 157: 1149-1169.
- Hennecke, J., A. Carfi et D. C. Wiley. 2000. Structure of a covalently stabilized complex of a human alphabeta T- cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1. *EMBO J* 19: 5611-5624.
- Hennecke, J. et D. C. Wiley. 2001. T cell receptor-MHC interactions up close. *Cell* 104: 1-4.
- Hogquist, K. A. 2001. Signal strength in thymic selection and lineage commitment. *Curr Opin Immunol* 13: 225-231.

- Housset, D., G. Mazza, C. Gregoire, C. Piras, B. Malissen et 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.
- Itoh, Y., M. Kajita, H. Kinoh, H. Mori, A. Okada et M. Seiki. 1999. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J Biol Chem* 274: 34260-34266.
- Janeway, C. A. Travers Paul. 1997. *Immunobiologie*, seconde édition. Paris, Bruxelles: De Boeck Université.
- Kappler, J., J. White, H. Kozono, J. Clements et P. Marrack. 1994. Binding of a soluble alpha beta T-cell receptor to superantigen/major histocompatibility complex ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8462-8466.
- Kaye, J., S. Porcelli, J. Tite, B. Jones et C. A. Janeway Jr. 1983. Both a monoclonal antibody and antisera specific for determinants unique to individual cloned helper T cell lines can substitute for antigen and antigen-presenting cells in the activation of T cells. *J Exp Med* 158: 836-856.
- Kotb, M. 1995. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clin Microbiol Rev* 8: 411-426.
- Koyasu, S., L. K. Clayton, A. Lerner, H. Heiken, A. Parkes et E. L. Reinherz. 1997. Pre-TCR signaling components trigger transcriptional activation of a rearranged TCR alpha gene locus and silencing of the pre-TCR alpha locus: implications for intrathymic differentiation. *Int Immunol* 9: 1475-1480.
- Kranz, D. M. 2000. Incompatible differences: view of an allogeneic pMHC-TCR complex. *Nat Immunol* 1: 277-278.
- Kronenberg, M., G. Siu, L. E. Hood et N. Shastri. 1986. The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 4: 529-591.
- Kruisbeek, A. M., M. C. Haks, M. Carleton, A. M. Michie, J. C. Zuniga-Pflucker et D. L. Wiest. 2000. Branching out to gain control: how the pre-TCR is linked to multiple functions. *Immunol Today* 21: 637-644.
- Kubo, R. T., W. Born, J. W. Kappler, P. Marrack et M. Pigeon. 1989. Characterization of a monoclonal antibody which detects all murine alpha beta T cell receptors. *J Immunol* 142: 2736-2742.
- Lacey, S. W., J. M. Sanders, K. G. Rothberg, R. G. Anderson et B. A. Kamen. 1989. Complementary DNA for the folate binding protein correctly predicts anchoring to the membrane by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Clin Invest* 84: 715-720.
- Lake, J. P., C. W. Pierce et J. D. Kennedy. 1991. T cell receptor expression by T cells that mature extrathymically in nude mice. *Cell Immunol* 135: 259-265.



- LaVallie, E. R., E. A. DiBlasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel et J. M. McCoy. 1993. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology (N Y)* 11: 187-193.
- Lorenz, R. G. et 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.
- Love, P. E. et E. W. Shores. 2000. ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity* 12: 591-597.
- Low, M. G., J. Stiernberg, G. L. Waneck, R. A. Flavell et P. W. Kincade. 1988. Cell-specific heterogeneity in sensitivity of phosphatidylinositol- anchored membrane antigens to release by phospholipase C. *J Immunol Methods* 113: 101-111.
- Lowry, O. H. Rosebrough N. J. Farr A. L. Randall R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Malissen, M., J. Trucy, E. Jouvin-Marche, P. A. Cazenave, R. Scollay et B. Malissen. 1992. Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol Today* 13: 315-322.
- McMurry, M. T. et M. S. Krangel. 2000. A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science* 287: 495-498.
- Metcalf, D. et M. Brumby. 1966. The role of the thymus in the ontogeny of the immune system. *J Cell Physiol* 67: Suppl 1:149-68.
- Meuer, S. C., K. A. Fitzgerald, R. E. Hussey, J. C. Hodgdon, S. F. Schlossman et E. L. Reinherz. 1983. Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J Exp Med* 157: 705-719.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky et A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395: 82-86.
- Plaksin, D., K. Polakova, P. McPhie et D. H. Margulies. 1997. A three-domain T cell receptor is biologically active and specifically stains cell surface MHC/peptide complexes. *J Immunol* 158: 2218-2227.
- Portoles, P., J. M. Rojo et C. A. Janeway Jr. 1989. Asymmetry in the recognition of antigen: self class II MHC and non-self class II MHC molecules by the same T-cell receptor. *J Mol Cell Immunol* 4: 129-137.
- Rammensee, H. G., T. Friede et S. Stevanoviic. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228.
- Reinherz, E. L., K. Tan, L. Tang, P. Kern, J. Liu, Y. Xiong, R. E. Hussey, A. Smolyar, B. Hare, R. Zhang, A. Joachimiak, H. C. Chang, G. Wagner et J. Wang. 1999. The crystal

structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 286: 1913-1921.

Reiser, J. B., C. Darnault, A. Guimezanes, C. Gregoire, T. Mosser, A. M. Schmitt-Verhulst, J. C. Fontecilla-Camps, B. Malissen, D. Housset et G. Mazza. 2000. Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule. *Nat Immunol* 1: 291-297.

Roberts, D. B., W. J. Mulvany, R. A. Dwek et P. M. Rudd. 1998. Mutant analysis reveals an alternative pathway for N-linked glycosylation in *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem* 253: 494-498.

Roth, M. E., P. O. Holman et D. M. Kranz. 1991. Nonrandom use of J alpha gene segments. Influence of V alpha and J alpha gene location. *J Immunol* 147: 1075-1081.

Rowen, L., B. F. Koop et L. Hood. 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272: 1755-1762.

Rudolph, M. G. et I. A. Wilson. 2002. The specificity of TCR/pMHC interaction. *Curr Opin Immunol* 14: 52-65.

Sambrook, J. et M. J. Gething. 1989. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342: 224-225.

Samelson, L. E. et R. H. Schwartz. 1983. The use of antisera and monoclonal antibodies to identify the antigen-specific T cell receptor from pigeon cytochrome c-specific T cell hybrids. *Immunol Rev* 76: 59-78.

Sebzda, E., M. Choi, W. P. Fung-Leung, T. W. Mak et P. S. Ohashi. 1997. Peptide-induced positive selection of TCR transgenic thymocytes in a coreceptor-independent manner. *Immunity* 6: 643-653.

Sebzda, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M. F. Bachmann et P. S. Ohashi. 1999. Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 17: 829-874.

Seth, A., L. J. Stern, T. H. Ottenhoff, I. Engel, M. J. Owen, J. R. Lamb, R. D. Klausner et D. C. Wiley. 1994. Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen in vitro. *Nature* 369: 324-327.

Sharp, L. L., D. A. Schwarz, C. M. Bott, C. J. Marshall et S. M. Hedrick. 1997. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity* 7: 609-618.

Shores, E. W. et P. E. Love. 1997. TCR zeta chain in T cell development and selection. *Curr Opin Immunol* 9: 380-389.

Shortman, K. 1992. Cellular aspects of early T-cell development. *Curr Opin Immunol* 4: 140-146.

- Shortman, K., M. Egerton, G. J. Spangrude et R. Scollay. 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol* 2: 3-12.
- Shusta, E. V., M. C. Kieke, E. Parke, D. M. Kranz et K. D. Wittrup. 1999. Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency. *J Mol Biol* 292: 949-956.
- Stern, L. J. et D. C. Wiley. 1994. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 2: 245-251.
- Stewart, E. J., F. Aslund et J. Beckwith. 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J* 17: 5543-5550.
- Sugawara, T., T. Moriguchi, E. Nishida et Y. Takahama. 1998. Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* 9: 565-574.
- Surh, C. D. et J. Sprent. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372: 100-103.
- Swain, S. L. 1983. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* 74: 129-142.
- Teng, M. K., A. Smolyar, A. G. Tse, J. H. Liu, J. Liu, R. E. Hussey, S. G. Nathenson, H. C. Chang, E. L. Reinherz et J. H. Wang. 1998. Identification of a common docking topology with substantial variation among different TCR-peptide-MHC complexes. *Curr Biol* 8: 409-412.
- Thompson, S. D., A. R. Manzo, J. Pelkonen, M. Larche et J. L. Hurwitz. 1991. Developmental T cell receptor gene rearrangements: relatedness of the alpha/beta and gamma/delta T cell precursor. *Eur J Immunol* 21: 1939-1950.
- Thorsby, E. 1999. MHC structure and function. *Transplant Proc* 31: 713-716.
- Tough, D. F. et J. Sprent. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* 179: 1127-1135.
- Turner, J. M., M. H. Brodsky, B. A. Irving, S. D. Levin, R. M. Perlmutter et D. R. Littman. 1990. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 60: 755-765.
- van der Merwe, P. A. 2000. Modeling costimulation. *Nat Immunol* 1: 194-195.
- van Meerwijk, J. P. et R. N. Germain. 1993. Development of mature CD8+ thymocytes: selection rather than instruction? *Science* 261: 911-915.
- van Oers, N. S., P. E. Love, E. W. Shores et A. Weiss. 1998. Regulation of TCR signal

transduction in murine thymocytes by multiple TCR zeta-chain signaling motifs. *J Immunol* 160: 163-170.

Viola, A. et A. Lanzavecchia. 1999. T-cell activation and the dynamic world of rafts. *APMIS* 107: 615-623.

von Boehmer, H., I. Aifantis, O. Azogui, C. Saint-Ruf et F. Grassi. 1999. The impact of pre-T-cell receptor signals on gene expression in developing T cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64: 283-289.

von Boehmer, H., P. Kisielow, H. Kishi, B. Scott, P. Borgulya et H. S. Teh. 1989. The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the alpha beta receptor for antigen. *Immunol Rev* 109: 143-151.

Wang, J., K. Lim, A. Smolyar, M. Teng, J. Liu, A. G. Tse, J. Liu, R. E. Hussey, Y. Chishti, C. T. Thomson, R. M. Sweet, S. G. Nathenson, H. C. Chang, J. C. Sacchettini et E. L. Reinherz. 1998. Atomic structure of an alphabeta T cell receptor (TCR) heterodimer in complex with an anti-TCR fab fragment derived from a mitogenic antibody. *EMBO J* 17: 10-26.

Weber, S., A. Traunecker, F. Oliveri, W. Gerhard et K. Karjalainen. 1992. Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 356: 793-796.

Werlen, G., B. Hausmann et E. Palmer. 2000. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406: 422-426.

Willcox, B. E., G. F. Gao, J. R. Wyer, C. A. O'Callaghan, J. M. Boulter, E. Y. Jones, P. A. van der Merwe, J. I. Bell et B. K. Jakobsen. 1999. Production of soluble alphabeta T-cell receptor heterodimers suitable for biophysical analysis of ligand binding. *Protein Sci* 8: 2418-2423.

Yancopoulos, G. D. et F. W. Alt. 1986. Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu Rev Immunol* 4: 339-368.

Zhu, C. et D. B. Roth. 1996. Mechanism of V(D)J recombination. *Cancer Surv* 28: 295-309.