

Université du Québec
Institut Armand-Frappier

**Rôle du récepteur de la protéine G 128 dans l'alloréactivité du TCR 2.102 contre
I-E^p.**

Par
Philippe Lamarche

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

Jury d'évaluation :

Examineur interne : Yves St-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe : Réjean Lapointe, Université de Montréal

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

©Droits réservés de Philippe Lamarche, 2009

RÉSUMÉ

L'arrivée sur le marché de plusieurs classes d'immunosuppresseurs a permis de considérer la transplantation comme une thérapie efficace. Cependant, les mécanismes entourant l'alloréactivité sont encore mal définis. Bien qu'il soit établi que l'alloréactivité soit induite par la reconnaissance des complexes CMH/peptides allogéniques par les lymphocytes T, la contribution des peptides du soi impliqués dans cette interaction reste grandement indéterminée. Notre laboratoire utilise un modèle d'étude du rejet de greffe basé sur le clone de cellule T 2.102, alloréactif contre I-E^P. L'importance de la contribution du peptide du soi impliqué dans cette réaction d'alloréactivité a déjà été démontrée par l'élaboration d'un peptide synthétique (EPM) permettant, lorsque présenté dans le cadre de I-E^P, une forte stimulation du clone T 2.102. Bien que le peptide naturel du soi impliqué dans l'alloréactivité face à I-E^P ne soit pas encore connu, le récepteur couplé à la protéine G 128 (GPR128) a pu être identifié comme un candidat potentiel. Une précédente étude a déjà démontré le potentiel d'activation de cet allopeptide GPR128(531-545) sur le TCR 2.102. Toutefois, sa nature d'allopeptide naturel reste à démontrer. L'objectif de ces travaux vise donc à déterminer si GPR128 se retrouve naturellement apprêté et présenté dans un contexte I-E^P.

Nous avons donc tenté de transfecter une lignée de fibroblastes (CHO-E^P) ainsi qu'un lymphome B (CH27-E^P), tout deux exprimant le CMH II I-E^P, à l'aide d'un vecteur permettant l'expression de GPR128. Toutefois, des problèmes techniques ont retardé le clonage de GPR128 et l'élaboration du vecteur d'expression. Nous avons donc procédé à l'évaluation de la capacité d'apprêtement et de chargement de l'épitope putatif GPR128(531-545) à l'aide de l'utilisation d'un vecteur d'expression en fusion avec la chaîne invariante permettant le ciblage des compartiments endosomaux et dont le fonctionnement fut déjà validé de façon antérieure à ces travaux. Ainsi, nous avons pu démontrer que l'épitope putatif GPR128(531-545) ne comportait pas de site de clivages spécifiques aux différentes cathepsines et peptidases retrouvées dans la voie d'apprêtement endosomale des fibroblastes (CHO-E^P) et des lymphomes B (CH27-E^P) et permet donc un apprêtement constructif. Nous avons aussi pu démontrer que la voie endosomale de ces deux lignées étaient apte à apprêter un segment plus important de GPR128 (GPR128(526-559)) de façon à générer une réponse alloréactive du clone T 2.102.

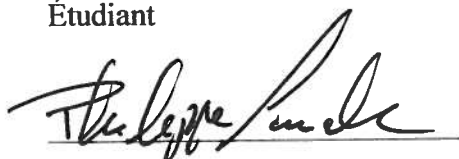
endosomale de ces deux lignées étaient apte à apprêter un segment plus important de GPR128 (GPR128(526-559)) de façon à générer une réponse alloréactive du clone T 2.102.

Durant ces travaux, nous avons dû élaborer un protocole de transfection transitoire du lymphome B, à l'aide de la microporation et permettant un important taux de transfection combiné à une faible mortalité. Le protocole mis en place nous a permis d'atteindre une efficacité de transfection particulièrement élevée pour un lymphome B.

De plus, lors de ces travaux, nous avons documenté l'expression de GPR128 dans les CPA. Ainsi nous avons pu démontrer la faible expression de GPR128 dans des CPA retrouvées dans la rate, suggérant alors que l'allopeptide GPR128(531-545) n'est apprêté et présenté que suite à la phagocytose de corps apoptotiques de cellules non immunitaires retrouvées dans la rate et exprimant un fort taux d'expression de GPR128.

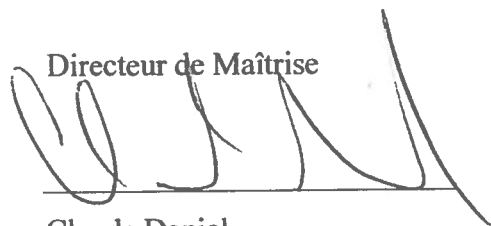
Afin de confirmer le rôle de GPR128(531-545) dans l'alloréactivité du TCR 2.102, des travaux restent encore à réaliser. En premier lieu, nous devons encore valider que l'expression de GPR128 sous sa forme intégrale dans des fibroblastes (CHO-E^p) et des lymphomes B (CH27-E^p) est apte à induire une réaction alloréactive face au TCR 2.102. En second lieu, l'utilisation d'ARNi *in vitro* et *in vivo* pourrait confirmer l'implication de GPR128(531-545) dans le processus alloréactif du TCR 2.102.

Étudiant



Philippe Lamarche

Directeur de Maîtrise



Claude Daniel

REMERCIEMENTS

Je tiens à prendre quelques lignes afin de remercier toutes les personnes qui ont cru en moi, m'ont soutenu et qui ont rendu la réalisation de cet objectif possible.

Tout d'abord, j'aimerais tout particulièrement remercier mon directeur de maîtrise, le Pr. Claude Daniel, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir donné la chance de découvrir le monde de la recherche. Son mentorat fut grandement apprécié et m'a permis d'approfondir mes aptitudes scientifiques. Par la même occasion, j'aimerais souligner l'aide que m'ont apporté tous les membres du laboratoire. Un grand merci à Véronique pour m'avoir permis d'approprier les techniques de biologie moléculaire et pour sa patience malgré mes questions inépuisables. Je tiens aussi à remercier Yvon pour ses nombreux conseils techniques ainsi que pour nos nombreuses conversations. J'aimerais également remercier les autres membres du laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler ces dernières années : Alban, Charles, Mériam, Alexandre, Caroline et Benoit.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes de l'Institut Armand-Frappier qui m'ont permis de rendre ceci possible. Tout particulièrement à Marcel pour son aide précieuse en microscopie et en cytométrie. Un gros merci aussi à Michel pour ses multiples conseils bibliographiques ainsi que pour sa sympathie. J'aimerais remercier aussi les membres des autres laboratoires pour leur aide, leur support ainsi que leur présence.

J'aimerais aussi prendre la peine de saluer et remercier toutes les personnes que j'ai croisées durant mon parcours académique et qui m'ont donné le goût des études et transmis cette soif d'apprendre.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille pour son support si apprécié ainsi que ses encouragements. Un gros merci à Manon ainsi qu'à Nicole pour leurs temps et conseils. Un merci tout particulier à Audrey qui a pris la peine de me connaître et m'a soutenu tout au long de ce processus.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. Introduction	3
II. Alloréactivité	4
A. Types d'alloréactivité	4
B. CMH et apprêtement des alloptides.....	7
1. CMH de classe I.....	8
2. CMH de classe II.....	10
III. Caractérisation des cellules T.....	14
A. Structure du TCR $\alpha\beta$	15
B. Éducation thymique.....	17
1. Stades de développement des thymocytes.....	18
2. Recombinaison VJ, VDJ et variabilité	19
3. Mécanismes des sélections positive et négative	20
IV. Spécificité du TCR.	24
A. Premières hypothèses : alloréactivité et l'implication des alloptides.....	24
B. Un TCR polyspécifique	25
1. Interactions TCR-pCMH.....	25
2. Alloréactivité et spécificité peptidique.....	30
3. Mimétisme moléculaire et polyspécificité.....	32
V. TCR 2.102.....	34
A. Dualité du TCR 2.102	35
B. Identification d'allopeptide et TCR 2.102.....	36
VI. GPR128.....	39
APPROCHE EXPÉRIMENTALE	41
I. Clonage du gène GPR128	41
A. Souris.....	41
1. Extraction d'ARN total	41
2. Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc).....	41
B. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	42
C. Manipulation d'ADN	43
1. Phosphorylation des amorces.....	43
2. Digestions	44
3. Génération d'extrémités franches	44
4. Déphosphorylation	44
5. Purification par phénol/chloroforme	45
6. Précipitation à l'éthanol.....	45
7. Purification d'ADN sur gel d'agarose.....	45
8. Dosage des acides nucléiques	46
9. Ligations	47
10. Vecteur utilisé	48
D. Transformation bactérienne	52
1. Subcloning Efficiency DH5 α	53

2.	dam-/dcm- competent E.coli.....	53
E.	Criblage des clones recombinants.....	53
1.	Miniprep par lyse alcaline	53
2.	Digestions et migration sur gel	54
F.	Séquençage	54
1.	Préparation de l'ADN	54
2.	Alignement	55
G.	Préparation d'ADN à grande échelle	55
II.	Évaluation du potentiel alloréactif de l'épitope GPR128(531-545) dans le modèle du TCR 2.102	55
A.	Lignées cellulaires	55
B.	Transfections transitoires	56
1.	Lipofectamine™ 2000.....	56
2.	Microporation	57
C.	Analyse de cytométrie en flux	57
D.	Test d'activation de l'hybridome T 2.102	58
II.	Quantification de l'expression de GPR128 dans différentes populations cellulaires de la rate	59
A.	Isolation et purification des populations	59
B.	Extraction d'ARN	59
C.	Synthèse d'ADN complémentaire	59
D.	RT-PCR quantitatif	59
	RÉSULTATS	61
I.	Clonage de GPR128	61
A.	Amplification de la séquence codante de GPR128.....	62
1.	Amplification en une seule étape.....	62
2.	Optimisation des conditions	63
3.	Tentative de PCR à extension par chevauchement.....	63
B.	Stratégie de clonage de GPR128 via clonage successif dans pBluescript SK II (-) phagemid	66
1.	Clonage.....	67
2.	Résultats du séquençage de la construction pBluescript II GPR128	68
C.	Clonage d'une région de GPR128 contenant l'épitope putatif dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 Zeo/ Ii.....	71
1.	Élaboration de la construction	71
2.	Transfection de la lignée CHO-E ^p à l'aide de lipofectamine™ 2000.....	72
3.	Tests d'activation de l'hybridome T 2.102 via l'utilisation de la construction pcDNA3.1 Ii GPR128(526-559)	73
D.	Confirmation de l'activation de l'hybridome T 2.102 par la présentation de l'épitope minimal par un complexe CHM II I-E ^p	74
1.	Élaboration des constructions minimales en fusion avec Ii	74
2.	Transfection des cellules CHO-E ^p à la lipofectamine 2000 et test d'activation sur l'hybridome T 2.102.....	75
E.	Modulation de la présentation de l'épitope minimal par ses extensions amino et carboxy-terminales	76
1.	Élaboration des constructions tronquées.....	76
2.	Test d'activation de l'hybridome T 2.102 à l'aide des constructions tronquées (526-545 et 531-559).....	77
F.	Transfection des constructions dans des cellules de lymphome B CH27-E ^p	79

G.	Confirmation des résultats obtenus à l'aide des constructions pcDNA3.1/Zeo II GPR128(526-559) clones B et C par microporation des CHO-EP	82
II.	Évaluation de l'expression de GPR128 dans diverses populations impliquées dans l'alloréactivité du clone 2.102 et présentes dans la rate de souris	84
	DISCUSSION	86
I.	Amplification de GPR128 dans son intégralité	88
II.	Utilisation d'un modèle d'expression en fusion avec la chaîne invariante (Ii)	91
A.	Évaluation de la capacité des fibroblastes à apprêter et présenter l'épitope GPR128(526-559)	92
B.	Évaluation de la capacité des lymphomes B à apprêter et présenter l'épitope GPR128(526-559)	93
III.	Rôle des CPA dans la présentation de l'épitope putatif de GPR128	97
	CONCLUSION	99
	FIGURES ET TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES	100
	BIBLIOGRAPHIE	104

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Alloréactivités des cellules T	6
Figure 2: Voies de présentation antigénique.....	8
Figure 3: Structure des domaines et des gènes d'un TCR $\alpha\beta$	16
Figure 4: Complexe TCR - CD3	17
Figure 5: Réarrangement des gènes codant pour le récepteur des cellules T $\alpha\beta$	20
Figure 6: Restriction et alloréactivité du TCR 2.102	36
Figure 7: Peptides identifiés reconnus par le TCR 2.102.	38
Figure 8 : Vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo (+).....	48
Figure 9 : Vecteur d'expression peGFP-N1.....	49
Figure 10 : Vecteur d'expression pBluescript II SK (-) Phagemid.....	50
Figure 11 : Vecteur d'expression Srapuro2IRESHrGFP.	51
Figure 12 : Vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo Ii.	52
Figure 13: Segment codant de GPR128 et organisation des exons et introns.	61
Figure 14: Stratégie initiale de clonage de GPR128 dans un vecteur pcDNA3.1/Zeo	62
Figure 15 : L'amplification de GPR128, intégral et partiel, à partir d'une matrice d'ADNc.....	63
Figure 16: Amplification de GPR128 en 3 segments.....	65
Figure 17: Différentes combinaisons d'extension par chevauchements.....	66
Figure 18: Clonage de GPR128 de façon successive dans un vecteur pBluescript II SK (-) phagemid	67
Figure 19 : Clonage de GPR128 de façon successive dans un vecteur pBluescript II SK (-) phagemid	68
Figure 20: Mutations retrouvées lors des séquençages des clones pBluescript GPR128	70
Figure 21: Stratégie de clonage d'une section de GPR128(526-559) contenant l'épitope putatif (531-545)	72
Figure 22: Efficacité de transfection et viabilité engendrées par la transfection à la Lipofectamine™ 2000 de la construction pcDNA3.1/Zeo GFP	73
Figure 23: Activation de l'hybridome T 2.102, stimulé par des CHO-E ^p transfectée à l'aide de la construction Ii-GPR128(526-559) et mesuré par la prolifération de la lignée CTLL-2.....	74
Figure 24: Schématisation des deux constructions pcDNA3.1/Zeo Ii GPR128(531- 545) et son analogue	75
Figure 25 : Activation de l'hybridome T 2.102 à l'aide de l'expression des constructions pcDNA3.1/Zeo Ii GPR128(531-545) et de son analogue dans des CHO-E ^p	76
Figure 26: Schématisation des deux constructions pcDNA3.1/Zeo Ii GPR128(526- 545) et (531-559).....	77
Figure 27: Test d'activation de l'hybridome T 2.102 à l'aide de CHO-Ep exprimant des constructions tronquées de pcDNA3.1 Ii GPR128(526-559)	78
Figure 28: Évaluation de l'efficacité de transfection de la lignée CH27-E ^p à l'aide d'une construction peGFP	79
Figure 29: Confirmation de l'efficacité de transfection de la lignée CH27-E ^p à l'aide d'une construction pcDNA3.1/Zeo GFP	80
Figure 30: Test d'activation de l'hybridome T 2.102 à l'aide de lymphomes B CH27- E ^p transfectés par microporation à l'aide de différentes constructions de GPR128	81
Figure 31: Mise au point de la transfection de la lignée CHO-Ep par microporation .	82

Figure 32 : Activation de l'hybridome T 2.102, stimulé par des CHO-E ^p transfectée par microporation et mesurée par la prolifération de la ligné CTLL-2.....	83
Figure 33: Expression relative de GPR128 dans diverses populations issues de rate de souris B6.AKR.....	85
Figure 34: Séquence codante de GPR128 (nm_172825).....	100
Figure 35: Visualisation de la position des passages transmembranaires de GPR128	101
Figure 36: Différences entre les séquences publiées nm_172825 et NT_039624.7 ..	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des structures de cristallographies résolues des complexes TCR $\alpha\beta$ /pCMH entre 1996 et 2007.	26
Tableau 2: Spécificité du clone T Hy.1B11 contre des peptides présentés dans un contexte syngénique CMH II DQ1.	33
Tableau 3: Séquences des amorces utilisées.	43
Tableau 4: Génotypes des souches bactériennes utilisées	53
Tableau 5: Séquences des amorces fournies par le service de séquençage.	54
Tableau 6: Amorces utilisées lors de l'évaluation du degré d'expression de GPR128 par PCR en temps réel.	60
Tableau 7: Position des répétitions microsatellites contenu dans la séquence nm_172825.	103

LISTE DES ABRÉVIATIONS

β_2m :	β_2 -microglobuline
$^{\circ}C$:	Degré Celcius
μl :	Microlitre
μM :	Micromolaire
ADN :	Acide déoxyribonucléotide
ADNc :	ADN complémentaire
AEP :	Asparagine endopeptidase
APC :	Allophycocyanine
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messagé
BLAST :	<i>Basic local alignment search tool</i>
BMP :	<i>Bone morphogenetic protein</i>
Bq :	Becquerel
BSA :	Albumine de sérum bovin
CDR :	Régions déterminant la complémentarité
Ci :	Curie
CIP :	Phosphatase alcaline intestinale de veau
CLIP :	Peptide de la chaîne invariante associée au CMH de classe II
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	Cytomégalovirus
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène
CPM :	Compte par minute
CTL :	Cellule T cytotoxique
DC :	<i>Dendritic cell</i>
DN :	Double négative
dNTPs :	Mélange des 4 déoxyribonucléotides (A,T,G,C)
DO :	Densité optique
DP :	Double positive
DPBS :	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EBNA1 :	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen 1</i>
eGFP :	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EMA :	Monoazide d'éthidium
ERAAP :	Amino-peptidase du réticulum endoplasmique
FACS :	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC :	Fluorescéine isothiocyanate
G :	Force gravitationnelle
GAPDH :	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GFP :	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR :	Récepteur couplé aux protéines G
GPS :	<i>GPCR proteolytic site</i>
Hb :	Hémoglobine
HPLC :	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HTLV-1 :	Virus humain lymphotrope-T de type 1
Ii :	Chaîne invariante
IL :	Interleukine
IP :	Iodure de propidium
ITAM :	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>

Kb :	Kilobase
LB :	Milieu de culture <i>Luria Bertani</i>
MBP :	Protéine basique de la myéline
MCS :	Région de sites de clonages multiples
MIIC :	<i>MHC class II compartment</i>
ml :	Millilitre
MS/MS :	Spectrométrie de masse en tandem
MT-SP1 :	<i>Mouse type II membrane serine protease</i>
NCBI :	Centre national pour l'information en biotechnologie
nm :	nanomètre
pb :	Paire de bases
pCMH :	Complexe peptide-CMH
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PE :	Phycoerythrine
pTa :	Pré-TCR α
RAG :	<i>Recombination activating gene</i>
RE :	Réticulum endoplasmique
RSS :	<i>Recombination signal sequences</i>
SBV :	Sérum bovin de veau
SOE :	<i>Splicing by overlap extension</i>
SP :	Simple positive
SVF :	Sérum de veau fœtal
TAP :	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TCR	Récepteur de cellules T
TdT :	Désoxynucléotidyl transferase terminale
TEC :	Cellule épithéliale du thymus
TLR :	<i>Toll-like receptor</i>
TPP II :	Tripeptidyl peptidase II

INTRODUCTION

L'étude des mécanismes régissant les réactions d'alloréactivité survenant à la suite de transplantations d'organes fut l'un des domaines d'études important du vingtième siècle. Bien que les TCR ainsi que les CMH de classe I et II furent analysés et décrits de façon approfondie, leurs interactions survenant lors des réactions d'alloréactivité restent encore à être définies. La spécificité du TCR pour le CMH allogénique reste pour le moment sujette à de nombreux débats. Plusieurs complexes TCR/CMH furent cristallisés et analysés. Aucun modèle ne permet cependant une comparaison du point de vue moléculaire de la reconnaissance conventionnelle et de l'alloréactivité engendrée par un même TCR. Le TCR 2.102 pourrait répondre à ce besoin, mais la réaction d'alloréactivité engendrée par ce dernier reste encore à être définie avant de pouvoir cristalliser celui-ci. Des travaux antérieurs ont démontré le caractère peptide dépendant de cette réaction d'alloréactivité, cependant aucun allopeptide permettant cette réaction n'a pu être identifié pour le moment. Par ailleurs, de récents travaux ont permis, à l'aide de recherche par bio-informatique, la mise en évidence d'un candidat potentiel. L'épitope putatif GPR128(531-545) possède la caractéristique de pouvoir permettre cette réaction lorsque ce dernier est chargé sur des cellules exprimant un CMH de classe II I-E^P. En outre, à défaut d'avoir pu isoler ce dernier à partir de la molécule I-E^P exprimée à la surface de cellules, nous n'avons aucune indication quant à savoir si cet épitope peut être généré de façon naturelle dans les CPA.

L'objectif du présent travail était donc d'évaluer, *in vitro*, si l'épitope GPR128(531-545) pouvait être généré et présenté de façon naturelle par des cellules exprimant un CMH de classe II I-E^P. Nous avons donc comme objectif, le clonage intégral de la protéine GPR128 afin d'induire une sur-expression de la protéine. Cette sur-expression, nous permettant ainsi d'évaluer la capacité des cellules à aiguiller la protéine vers les MIIC, de permettre un apprêtement adéquat et de conduire à une présentation de l'épitope GPR128(531-545) apte à restaurer l'alloréactivité du TCR 2.102 contre le CMH de classe II I-E^P. De plus, afin de confirmer que l'épitope peut être apprêté de façon constructive par les différentes cathepsines et enzymes de la voie de présentation, nous avons comme objectif d'exprimer un segment de la protéine GPR128, comportant l'épitope putatif, directement dans les MIIC. Le ciblage des MIIC fut donc obtenu à l'aide d'une construction fusionnant un segment de GPR128,

comportant l'épitope putatif, à la chaîne invariante Ii. Enfin, le profil d'expression de GPR128 chez les différentes populations immunitaires n'étant pas encore disponible, nous avons comme objectif d'évaluer si la génération de l'épitope, GPR128(531-545), dans les CPA allogéniques s'effectue à l'aide d'un processus d'apprêtement tel que l'autophagie ou si elles s'approprient cet épitope en phagocytant ce dernier dans leur environnement tissulaire. La caractérisation du profil d'expression de GPR128 dans les populations immunitaire de la rate de souris a donc été effectuée par PCR en temps réel semi-quantitatif.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction

De nombreuses créatures hybrides ont peuplé la mythologie grecque telles que les centaures ou la Chimère. Cependant, c'est dans l'horticulture que prend naissance le concept de greffe. Déjà dans la Chine ancienne la greffe et les boutures se pratiquaient en botanique. Puis cet usage s'est répandu en Grèce et dans les états Hébreux (Webster 1995). Le terme greffe apparaît donc dès l'Antiquité.

Les premières greffes animales ont eu lieu au 16^e siècle avec le développement de la zoologie par les naturalistes. Abraham Trembley sera le premier à réaliser des greffes permanentes sur des tissus animaux lors de ses travaux sur l'hydre (Lenhoff 1984). Puis c'est en 1869, avec les travaux du chirurgien Jacques Louis Reverdin, que l'on peut observer la première autogreffe épidermique réussie chez l'homme.

À l'aube du 20^e siècle, bien que les autogreffes soient réalisées avec succès, les recherches sur les allogreffes sont encore peu avancées. Ce sont alors les travaux d'Emerich Ullmann qui vont permettre de lever le voile sur les allogreffes. Celui-ci, considéré comme le père de la transplantation intestinale, va réaliser les premières expériences sur les transplantations d'organes (Ullmann 1902, 1902, 1914; Druml 2002). Cependant, l'ensemble de ces greffes sont de courtes durées principalement dû à des complications infectieuses et thrombotiques.

C'est en 1902 qu'Alexis Carrel met au point la technique chirurgicale d'anastomose vasculaire permettant de joindre les vaisseaux sanguins, qui va lui permettre de réaliser la première auto-transplantation rénale avec une survie prolongée du receveur et du greffon (Carrel 1902; Carrel 1909). Durant la même année, George Schöne publie les six lois classiques de la transplantation qui, en absence d'immunosuppression, sont toujours d'actualité (*Carrel A: Nobel Lectures in Physiology or Medicine 1901 - 1921*; Moris et al. 2001). Ces dernières mettent en évidence cependant l'incidence des réactions alloréactives et leurs implications dans le mécanisme de rejet.

L'immunologie moderne émergea suite à une succession d'observations majeures. Le fondement immunitaire des épisodes de rejet de greffes fut démontré en 1944 par les travaux de Medawar alors que ce dernier étudiait l'incidence des rejets de greffes épidermiques (Gibson et Medawar 1943; Medawar 1944). Puis des travaux publiés en 1953 par Billingham et collaborateurs, permirent de démontrer que

l'acceptation d'une greffe épidermique pouvait être induite par l'inoculation de cellules issues de la rate d'un individu adulte dans un individu au stade fœtal ou prénatal (Billingham, Brent, et Medawar 1953). Enfin l'utilisation d'immunosupresseurs démontra leur capacité à augmenter la survie des greffons (Billingham, Krohn, et Medawar 1951; Morgan 1951).

II. Alloréactivité

Les premières tentatives de transplantation, en absence d'immuno-suppression, se sont avérées des échecs répétés dans la mesure où les réponses immunitaires impliquées engendraient différentes formes de rejet. Bien que la découverte par Karl Landsteiner, en 1901, des groupes érythrocytaires ABO permit d'améliorer grandement la compréhension des systèmes de compatibilité, ce n'est qu'avec l'identification des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) que le concept d'alloréactivité pris son essor. Les CMH sont un groupe de gènes, situés sur le chromosome 6 chez l'humain et 17 chez la souris, qui codent pour des protéines hautement polymorphiques et dont la structure s'apparente à celle des immunoglobulines (Pullen et al. 1992; Fairchild 1998). Ces dernières permettent au système immunitaire de pouvoir distinguer le soi du non soi en interagissant avec le TCR des cellules T. Ainsi, lors de réaction immunitaire contre un greffon, les cellules T alloréactives de l'individu vont reconnaître un complexe CMH-peptide (pCMH) non rencontré lors de la maturation thymique (Sherman et Chattopadhyay 1993; Felix et Allen 2007).

A. Types d'alloréactivité.

Le rejet se caractérise par deux phases distinctes. La première est une phase de sensibilisation où on observe une prolifération des lymphocytes du receveur qui sont réactifs aux allo-antigènes. La seconde phase est une phase effectrice, pendant laquelle on peut observer la destruction immunitaire du greffon (Kuby et al. 2001).

Lors de la phase de sensibilisation, les cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ du receveur vont reconnaître une association de la molécule du CMH du donneur et d'un peptide. Les peptides qui proviennent de l'intérieur de la cellule allogénique sont habituellement présentés par les molécules CMH de classe I alors que les molécules du CMH de classe II vont présenter des peptides que la cellule a préalablement phagocytés puis apprêtés (Zinkernagel et Doherty 1974; Katz et al. 1975; Kuby et al. 2001).

La prolifération des cellules T suite à la reconnaissance d'un allo-antigène, peut être engendrée via deux voies, soient les voies directes et indirectes (**Figure 1**).

Une reconnaissance directe est engendrée lorsque les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du donneur, appelées leucocytes passagers, présentent les complexes peptide/CMH aux cellules T alloréactives du receveur (Larsen et al. 1990; Chen et al. 2003; Reed et al. 2003; Richards et al. 2004; Merad, Collin, et Bromberg 2007) (**Figure 1 A**). Ainsi, les allo-CMH I vont pouvoir être reconnus par les cellules T alloréactives CD8+ alors que les allo-CMH II vont pouvoir être reconnus par les cellules T alloréactives CD4+ (Le Moine, Goldman, et Abramowicz 2002).

Cette reconnaissance directe est possible suite à la migration des CPA du donneur dans les organes lymphoïdes secondaires (Larsen et al. 1990). Cette migration est induite à la suite de leur activation. Le traumatisme généré par la chirurgie, lié à l'implantation du greffon, est suffisant pour induire la maturation chez les cellules dendritiques (DC) présentes à l'intérieur du greffon (Larsen et al. 1990; Le Moine, Goldman, et Abramowicz 2002). À la suite de cette maturation, les DC augmenteront l'expression de certaines molécules. L'expression des molécules du CMH sera augmentée ainsi que les molécules de co-stimulations telles que CD80, CD86 et CD40. De plus, les cellules vasculaires du greffon peuvent directement présenter, via leur CMH I, aux cellules T alloréactives du receveur (Merad, Collin, et Bromberg 2007). La voie directe peut aussi être engagée en absence de peptides et être induite par la reconnaissance du CMH allogénique uniquement (Dupont, Herbert, et Warrens 2003).

Quant à la reconnaissance indirecte, elle est initiée par les CPA du receveur qui internalisent les molécules de CMH ou les antigènes mineurs d'histocompatibilité des cellules du greffon, les apprêtent, puis présentent des fragments peptidiques de ces antigènes aux cellules T (Dupont, Herbert, et Warrens 2003; Bharat et Mohanakumar 2007) (**Figure 1 B**). Cette voie implique donc majoritairement les cellules T CD4+ qui vont reconnaître les CMH II du soi présentant des allopeptides (Fangmann, Dalchau, et Fabre 1992; Fangmann et al. 1992). De plus, plusieurs modèles de transplantation ont démontré le rôle de l'alloréactivité indirecte dans les épisodes de rejets chroniques (Gokmen, Lombardi, et Lechler 2008). Il a notamment été démontré que la voie d'alloréactivité indirecte était suffisante afin d'induire les vascularites reliées au rejet chronique et l'artériosclérose du greffon (Ensminger et al. 2002; Shirwan et al. 2003; Yamada et al. 2003). La voie indirecte fut aussi fortement reliée à

l'incidence des rejets chroniques lors de l'utilisation d'un modèle de transplantation de trachée (Chalermskulrat et al. 2003; Richards et al. 2004).

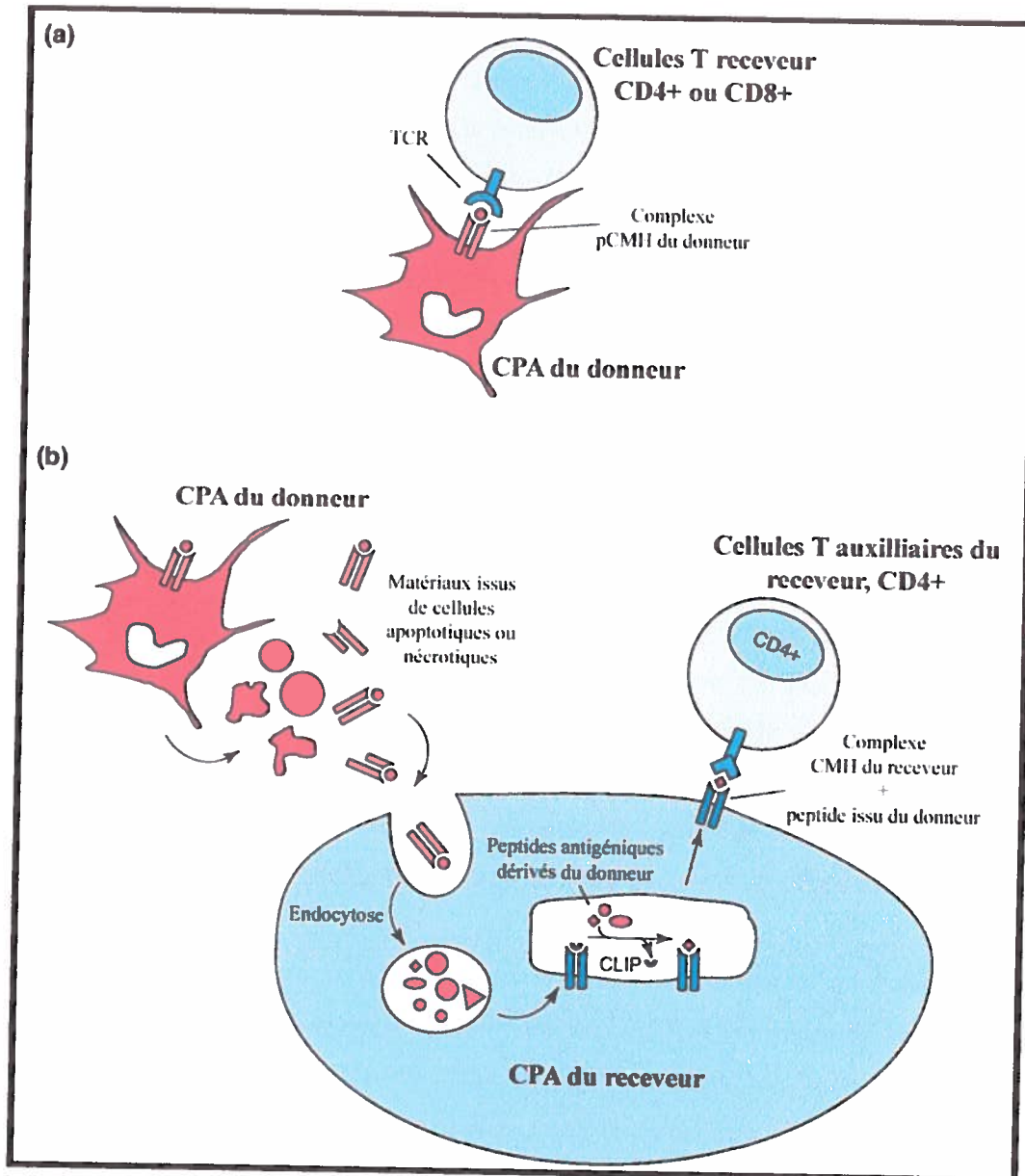


Figure 1 : Alloréactivités des cellules T

Voies d'alloréactivité directe (a) et indirecte (b). La voie directe (a) implique la reconnaissance directe du complexe pCMH allogénique présenté par les CPA du donneur. La voie indirecte (b) implique l'apprêtement et la présentation des peptides antigéniques, issus des cellules apoptotiques ou nécrotiques du donneur, par les CPA du receveur. Modifiée de (Gokmen, Lombardi, et Lechler 2008).

B. CMH et apprêtement des allopeptides.

Tel que nous venons de l'aborder, les différentes voies d'alloréactivité requièrent des voies de présentation qui sont dites directes et indirectes. Alors que la voie directe consiste en la reconnaissance d'un CMH de classe I ou II allogénique, l'alloréactivité indirecte consiste en la reconnaissance d'allopeptides présentés dans un contexte de CMH de classe II du soi. Dans ces deux voies de présentation, les CMH exprimés à la surface de la cellule contiennent des peptides qui vont altérer légèrement leurs conformations et stabiliser les complexes (Carven et al. 2004; Glithero et al. 2006). L'origine des peptides présentés par les deux classes de CMH a fait l'objet de très nombreux travaux et s'avère être très variable. Des analyses, notamment par spectrométrie de masse, ont démontré que ces peptides sont dérivés de protéines extracellulaires, transmembranaires ou intracellulaires et ce pour les deux classes de CMH (Falk et al. 1991; Chicz et al. 1992; Hunt, Henderson et al. 1992; Hunt, Michel et al. 1992; Dongre et al. 2001; Felix et al. 2006; Felix et al. 2007). Les CMH doivent, de par leurs fonctions, présenter une large diversité de peptides et leurs motifs de liaisons peptidiques sont plutôt dégénérés (Wucherpfennig et al. 2007). Ces peptides sont liés dans une niche peptidique, composée de deux hélices α séparées par sept feuillets β anti parallèles (Fairchild 1998; Rudolph, Stanfield, et Wilson 2006). Les peptides y sont maintenus via l'interaction de certains résidus peptidiques, appelés ancrages, et des régions du CMH formant des poches (Jensen 2007). Ces poches sont composées de résidus polymorphiques et ce sont ces derniers qui caractérisent le motif de liaison peptidique propre à chaque allèle de CMH (Rudensky, Mazel, et Yurin 1990; Falk et al. 1991; van Bleek et Nathenson 1991). De plus, un réseau de liaisons hydrogènes conservées interagit avec la chaîne latérale du peptide, contribuant à la conformation du peptide et à la stabilité du complexe (Jensen 2007). Toutefois, la distribution de ces poches et de ces liaisons hydrogènes diffère selon la classe de CMH (Jensen 2007). Bien que les deux classes de CMH nécessitent la présence de peptides pour stabiliser leurs complexes, les voies d'apprêtement et de chargement utilisées sont alors propres à chacun des récepteurs.

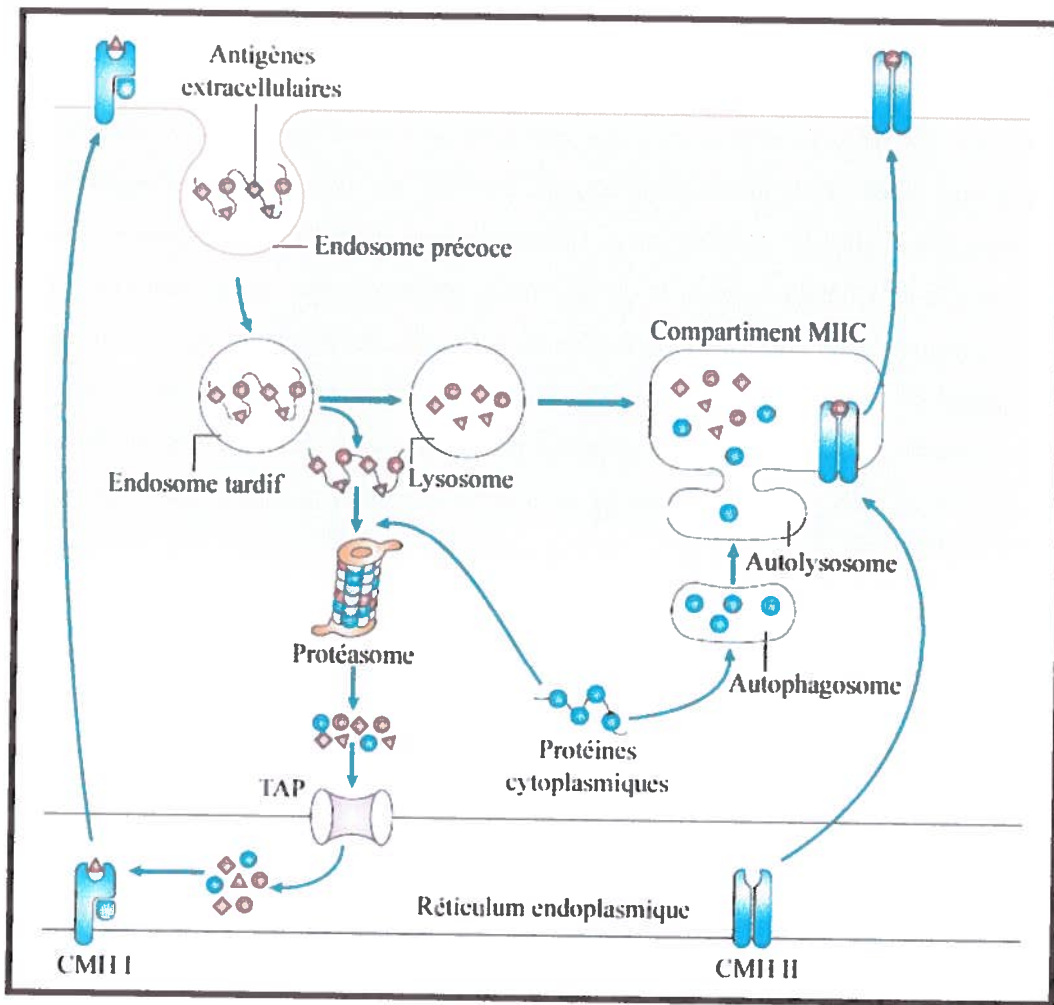


Figure 2: Voies de présentation antigénique.

Modifié de (Felix et Allen 2007)

1. CMH de classe I

Les CMH de classe I sont des hétérodimères de glycoprotéines composées d'une chaîne lourde α de 45 kDa associée de façon non covalente à une chaîne invariante légère β_2 -microglobuline (β_2m) de 12 kDa (Strominger et al. 1976; York et Rock 1996; Little et Parham 1999; Rudolph, Stanfield, et Wilson 2006). Cette voie de présentation antigénique est active dans la plupart des types cellulaires et est principalement impliquée dans la présentation de peptides intracellulaires aux cellules T CD8+. Cette dernière témoigne des événements intracellulaires (infections virales, infections bactériennes intracellulaires et transformation cellulaire) en présentant un échantillon de l'ensemble des protéines synthétisées (Jensen 2007; Vyas, Van der Veen, et Ploegh 2008). La niche peptidique des CMH I est composée des domaines α_1 et α_2 de la chaîne lourde, est fermée aux deux extrémités et ses points d'ancrages sont

situés aux deux extrémités. La longueur des peptides présentés est généralement de l'ordre de 8 à 10 résidus (Chang et al. 2005).

Les protéines cellulaires destinées à être dégradées sont préalablement ubiquitinyllées puis dirigées vers le protéasome (**Figure 2**). Ce dernier génère des peptides possédant une longueur de 2 à 25 acides aminés et sont par la suite dégradés par d'autres peptidases cytoplasmiques (Shastri, Schwab, et Serwold 2002; Kloetzel 2004; Rock, York, et Goldberg 2004). La peptidase cytoplasmique TPPII (tripeptidyl peptidase II) contribue au répertoire de peptides en digérant les produits issus du protéasome et génère des peptides d'une longueur de 15 acides aminés (Reits et al. 2004). Ces peptides sont ensuite transportés du cytoplasme en direction du réticulum endoplasmique (RE) à l'aide du complexe transporteur d'antigène TAP (**Figure 2**) (Vyas, Van der Veen, et Ploegh 2008). À l'intérieur du RE, la chaîne lourde du CMH de classe I s'assemble en premier lieu avec la β_2m puis avec les différents peptides apportés par le complexe TAP (transporter associated with antigen processing). Ce chargement requiert l'intervention de plusieurs autres protéines. L'assemblage de la chaîne lourde du CMH I est effectuée à la β_2m à l'aide de l'intervention de la chaperonne calnexine. Par la suite, la calreticuline, l'Erp57 et la tapasine contribuent au chargement du peptide dans la niche peptidique du CMH I. Plusieurs travaux semblent démontrer que lors de cette étape, plusieurs peptides vont s'échanger cette position dans la niche peptidique avant l'exportation du complexe pCMH I vers la surface cellulaire (**Figure 2**) (Sijts et Pamer 1997; Lewis et Elliott 1998; Elliott et Williams 2005). La tapasine contribue grandement au contrôle de la qualité car cette dernière permet la rétention des complexes pCMH I instables dans le RE ainsi que la récupération des complexes pCMH I qui ont quitté le RE avec un peptide sous-optimal (Howarth et al. 2004; Paulsson et al. 2006). L'amino-peptidase du réticulum endoplasmique (ERAAP) contribue aussi au répertoire de peptides liés aux complexes CMH I en s'attaquant à la portion C-terminale des peptides et leur attribue une longueur de 8 à 10 acides aminés (Chang et al. 2005). L'ERAAP possède toutefois la capacité de tailler les peptides jusqu'à détruire les déterminants reconnus par les cellules T (Kanaseki et al. 2006). Cependant, les CMH I, en se liant aux peptides, peuvent protéger les déterminants antigéniques de leur destruction par la ERAAP (Kanaseki et al. 2006). Puis, une fois stabilisé, le complexe pCMH I est exporté vers la surface cellulaire.

2. CMH de classe II

Les CMH de classes II sont des hétérodimères composés d'une chaîne α de 33 kDa et d'une chaîne β de 28 kDa, associées de façon non-covalente (Fairchild 1998). Contrairement à la voie de présentation antigénique CMH I, les CMH II ne sont exprimés de façon constitutive qu'uniquement sur les CPA telles que les DC, les macrophages, les cellules B ainsi que les cellules épithéliales du thymus (TEC) (Jensen 2007; Vyas, Van der Veen, et Ploegh 2008). Cependant, l'expression de CMH II peut être induite, par des signaux pro-inflammatoires, de façon transitoire chez plusieurs autres types cellulaires telles que les cellules endothéliales et les fibroblastes (Honey et Rudensky 2003). Cette voie permet principalement la présentation de peptides d'origines extracellulaires aux cellules T CD4+. La niche peptidique des CMH II, composée des domaines α_1 et β_1 , est ouverte et peut accommoder des peptides dont la longueur varie grandement (Jensen 2007).

Les antigènes qui seront internalisés par des voies telles que la phagocytose, la macropinocytose ou l'endocytose médiée par des récepteurs, seront dirigés vers les compartiments endosomaux où leur apprêtement débutera (**Figure 2**). L'origine de ce matériel extracellulaire peut être des micro-organismes tels que des virus ou des bactéries, mais des corps apoptotiques vont aussi emprunter cette voie (Henry et al. 2004). Les phagosomes vont par la suite interagir avec les lysosomes pour devenir des phagolysosomes (**Figure 2**). L'acidification du milieu va par la suite permettre la dégradation optimale des peptides à l'aide des différentes hydrolases et cathepsines (Honey et Rudensky 2003). L'identification avec précision de ces dernières reste toutefois encore à l'étude (Honey et Rudensky 2003). Des études *in vitro* ont indiqué que les cathepsines D et E pouvaient avoir un rôle à jouer dans la génération des peptides (Bennett et al. 1992; Rodriguez et Diment 1992; van Noort et Jacobs 1994). Toutefois, ces dernières ne semblent pas essentielles pour la présentation de complexe pCMH II (Deussing et al. 1998). Quant aux cathepsines S et L, elles semblent essentielles à la génération de certains peptides alors que d'autres peptides vont être complètement dégradés par leur présence (Honey et Rudensky 2003). De plus, il a été démontré que le répertoire de peptides endogènes présenté dans un contexte de CMH II était grandement influencé par la présence des cathepsines S et L (Honey et Rudensky 2003). Chez les DC, la dégradation des peptides contenus dans la voie

endosomale est hautement régulée d'une façon dépendante à leur activation (Trombetta et al. 2003).

Cependant, bien que l'internalisation d'antigènes extracellulaires reste la principale voie d'acquisition d'antigènes pour les CMH II, l'autophagie est maintenant considérée comme un mécanisme important employé dans cette voie (**Figure 2**) (Vyas, Van der Veen, et Ploegh 2008). Il a été démontré que les CPA vont utiliser l'autophagie de façon constitutive (Schmid, Pypaert, et Munz 2007) mais que cette dernière peut être modulée par l'intervention de certaines cytokines (Schmid et Munz 2007). De plus, l'activation des TLR4 et TLR7 (toll-like receptor) chez le macrophage contribue à augmenter grandement ces processus de présentation par autophagie (Xu et al. 2007; Delgado et al. 2008). L'autophagie permet de présenter des peptides endogènes par la voie CMH II et de collaborer à l'établissement de la tolérance au soi (Schmid et Munz 2007; Vyas, Van der Veen, et Ploegh 2008). Cette voie permet de contribuer grandement à la diversité des peptides retrouvés dans les complexes pCMH II qui sont originaires de protéines retrouvées dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau (Dengjel et al. 2005). Celle-ci semble aussi jouer un important rôle dans le façonnement du répertoire de cellules T CD4⁺ car les TEC, impliquées dans les processus de sélection thymique, présentent un haut niveau d'autophagie constitutionnelle (Mizushima et al. 2004; Kyewski et Klein 2006). D'ailleurs, des mutations dans les gènes ATG16L1 et IRCM, tous deux présents chez des patients atteints de la maladie auto-immunitaire de Crohn, semblent être reliées à l'autophagie (Parkes et al. 2007; Rioux et al. 2007). De plus, cette voie peut être utilisée pour la présentation d'antigènes viraux tel que démontré dans le cas de l'antigène EBNA 1 du virus Epstein-Barr (Paludan et al. 2005). L'utilisation de cette voie permet aussi de contribuer à l'élimination de pathogènes intracellulaires tel que *Mycobacterium tuberculosis* (Gutierrez et al. 2004), *Streptococcus pyogenes* (Nakagawa et al. 2004), *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Birmingham et al. 2006) et *Toxoplasma gondii* (Ling et al. 2006).

L'assemblage des chaînes α et β des CMH II a lieu dans le RE et requiert l'assistance de la chaîne invariante (Ii ou CD74) (Sant et Miller 1994). La présence de cette chaperonne transmembranaire de type II (Ii), permet d'assembler de façon stable le CMH II et génère un complexe comprenant trois dimères $\alpha\beta$ de CMH II liés à un trimère de Ii (Cresswell 1996). Les signaux contenus dans les domaines cytoplasmiques des chaînes invariantes vont permettre d'aiguiller ces complexes en

direction de la voie endosomale-lysosomale (**Figure 2**) (Cresswell 1996). De plus, un segment de Ii, baptisé peptide de la chaîne invariante associée au classe II (CLIP), occupe la niche peptidique du CMH II afin d'empêcher un chargement de peptide prématuré lors de son transit vers la voie endosomale-lysosomale (Roche et Cresswell 1990; Ghosh et al. 1995; Morkowski et al. 1995; Busch et al. 1996).

Les CMH II sont par la suite concentrés dans des compartiments de la voie endosomale tardive appelés compartiments MHC (Figure 2) (Rocha et Neefjes 2008). Une fois dans ces compartiments, la chaîne invariante (Ii) sera dégradée par différentes protéases lysosomales et laissera en place la portion CLIP dans la niche peptidique (Maric, Taylor, et Blum 1994; Riese et al. 1996). Les cathepsines sont une famille de protéases et dont plusieurs (cathepsines S, L, F, V, B, D, W ainsi que l'asparagine endopeptidase (AEP)) sont associées de façon plus ou moins importante au mécanisme d'apprêtement (Zavasnik-Bergant et Turk 2006). L'utilisation d'inhibiteurs analogues au substrat de certaines cathepsines a permis de démontrer que les cathepsine S et L étaient indispensables à la dégradation de la chaîne invariante et à la présentation de peptides par la voie CMH II (Riese et al. 1996; Nakagawa et al. 1998; Riese et al. 1998). L'expression de ces cathepsines diffère cependant selon le type cellulaire. Ainsi l'activité des cathepsines S est principalement observée dans les cellules B, les DC et les macrophages (Pierre et Mellman 1998; Honey et Rudensky 2003), alors que l'activité de la cathepsine L est principalement observée dans les TEC et les macrophages (Honey et Rudensky 2003). Les cathepsines B et D, exprimées chez les APC, semblent aussi participer à l'apprêtement des peptides et à la dégradation de la chaîne invariante toutefois, leur activité ne semble pas indispensable à un apprêtement adéquat (Deussing et al. 1998; Honey et Rudensky 2003; Chapman 2006). La cathepsine W est exprimée principalement par les cellules NK et les cellules T cytotoxiques CD8⁺ mais son rôle n'est pas clairement identifié pour le moment (Zavasnik-Bergant et Turk 2006). Quant à l'AEP, un rôle important dans l'initiation du clivage de Ii dans les cellules B et DC lui fut attribué suite à des travaux utilisant des inhibiteurs peptidiques (Manoury et al. 2003). De plus, il a été observé que l'AEP tient un rôle important dans l'apprêtement et la présentation d'un antigène de la toxine tétanique (Manoury et al. 1998).

Le chargement de peptides dans la niche peptidique des CMH II est catalysé par la chaperonne HLA-DM (H-2M chez la souris). Cette dernière permet de remplacer le CLIP par un peptide apprêté dans la voie endosomale-lysosomale

(Denzin et Cresswell 1995; Sherman, Weber, et Jensen 1995; Sloan et al. 1995; Jensen 2007). HLA-DM est un CMH II non-polymorphique qui possède son propre signal lui permettant de cibler les compartiments endosomaux (Jensen 2007). Cette chaperonne n'interagit pas directement avec les peptides mais avec le CMH II et facilite la libération du CLIP et son échange avec un peptide (Jensen 2007). De plus, les derniers travaux renforcent l'hypothèse selon laquelle HLA-DM favorise la présentation des peptides engendrant le complexe pCMH le plus stable et façonne donc ainsi le répertoire de peptides chargés dans la niche peptidique (Denzin et al. 2005; Lazarski et al. 2005; Lazarski, Chaves, et Sant 2006). Toutefois, il n'est pas encore clairement identifié si l'apprêtement des peptides par les différentes cathepsines et hydrolases s'effectue avant ou après la liaison de l'épitope dans la niche peptidique du CMH II (Sercarz et Maverakis 2003; Trombetta et Mellman 2005). Une fois le complexe pCMH II étant stabilisé, ce dernier est exporté vers la surface (**Figure 2**).

Dans les cellules B, les DC ainsi que dans les TEC, le répertoire de peptide présenté, l'immunopeptidome, peut être aussi modulé par HLA-DO (H-2O chez la souris) (Denzin et al. 2005). Cet hétérodimère, constitué des sous-unités DOA et DOB, est un CMH II non-polymorphique dont les formes humaine et murine affichent une très grande homologie de séquences (Inoko et al. 1985; Serenius, Rask, et Peterson 1987; Jonsson et Rask 1989; Naruse et al. 1999; Naruse et al. 2002; van Lith, van Ham, et Neefjes 2002). La modulation induite par HLA-DO est dépendante de son interaction avec HLA-DM. Cette association débute dans le RE où HLA-DO interagit avec HLA-DM afin de former le complexe DMDO, puis ce dernier migre vers les MIIC (Liljedahl et al. 1996). Plusieurs travaux ont déjà démontré que HLA-DM inhibe les fonctions de HLA-DM, réduit le nombre de peptides chargés dans la niche peptidique des CMH II et augmente la proportion de CMH II présentant le CLIP à la surface cellulaire (Denzin et al. 1997; van Ham et al. 1997; Liljedahl et al. 1998; Denzin et al. 2005). De plus, le haut niveau d'expression de HLA-DO retrouvé dans les DC lymphoïdes réduit la présentation de peptide du soi et corrèle bien avec l'induction de tolérance attribué à ce type cellulaire (Steinman et Inaba 1999; Denzin et al. 2005). L'impact *in vivo* de HLA-DO sur l'immunopeptidome fut par ailleurs clairement démontré à l'aide de souris H-2O^{-/-}. Ces travaux permirent d'observer que 26% des peptides élués des CHM II présent à la surface des splénocytes sauvages n'étaient pas retrouvés chez les mutants H-2O^{-/-} (Perradeau et al. 2000). D'autre part 43% des peptides présentés par les mutants H-2O^{-/-} ne le sont pas chez les splénocytes

sauvages (Perraudeau et al. 2000). En outre, les mécanismes par lesquels HLA-DO effectue cette modulation de l'immunopeptidome sont pour le moment encore inconnus. Bien que certains travaux suggèrent une régulation pH dépendante de l'activité inhibitrice de DO sur DM (Liljedahl et al. 1996; Kropshofer et al. 1998; van Ham et al. 2000), cette hypothèse est encore controversée et d'autres travaux sont requis afin de la confirmer (Denzin et al. 2005).

III. Caractérisation des cellules T

Les cellules T sont un élément fondamental de l'immunité spécifique. Quatre sous-populations de cellules T sont recensées; les cellules T auxiliaires (T helper), les cellules T cytotoxiques (CTL), les cellules T régulatrices et les cellules T $\gamma\delta$.

Les cellules T auxiliaires et cytotoxiques représentent la majorité des cellules T présentes dans l'organisme et sont impliquées grandement dans les réponses humorales et cytotoxiques (Kindt et al. 2008). Les cellules T auxiliaires sont caractérisées par l'expression du co-récepteur membranaire CD4, alors que les cellules T cytotoxiques expriment le CD8 à leur surface (Kindt et al. 2008). Ces deux populations vont exprimer un récepteur de cellule T (TCR) composé des chaînes α et β , dont la recombinaison et l'expression s'effectuera durant leur maturation thymique. Ce récepteur leur permettra d'interagir avec le complexe pCMH de classe I ou II. Les cellules T auxiliaires CD4+ interagissent habituellement avec des complexes pCMH II alors que les cellules T cytotoxiques vont interagir avec des pCMH I.

Les cellules T régulatrices, pour leur part, représentent une sous-population de cellules T CD4+ qui expriment fortement la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) ainsi que le facteur de transcription FoxP3 (Sakaguchi 2004). Ces dernières sont principalement impliquées dans la régulation des processus immuns, de l'homéostasie lymphocytaire et de la tolérance périphérique (Zhu et Paul 2008).

Quant aux cellules T $\gamma\delta$, elles sont pour le moment peu connues mais elles semblent jouer un rôle important dans l'immunité innée (Casetti et Martino 2008). Ainsi, il a été démontré que ces cellules sont impliquées dans la réponse face à certaines infections bactériennes, parasitaires, virales ainsi que dans la reconnaissance des cellules tumorales (De Paoli et al. 1991; Chen et Letvin 2003; Gober et al. 2003; Born et al. 2007). De plus, il a été démontré que les cellules T $\gamma\delta$ étaient aptes à induire la maturation, l'activation et la migration des DC (Ismaili et al. 2002; Munz,

Steinman, et Fujii 2005). Ces dernières expriment un TCR composé des chaînes $\gamma\delta$ et quittent le thymus de façon très précoce. Ces cellules semblent répondre à des antigènes non-peptidiques phosphorylés via l'interaction avec leur TCR (Tanaka et al. 1994). Ces cellules T ne représentent qu'un faible pourcentage (< 5%) des thymocytes matures (Kindt et al. 2008).

A. Structure du TCR $\alpha\beta$

Le TCR des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ est un hétérodimère constitué des chaînes α/β . Ce récepteur, partageant l'organisation de ces domaines ainsi qu'un mode de liaison avec les fragments Fab des anticorps, fait partie de la superfamille des immunoglobulines (Davis et Bjorkman 1988; Claverie, Prochnicka-Chalufour, et Bougueleret 1989; Garcia, Teyton, et Wilson 1999; Rudolph, Stanfield, et Wilson 2006; Kindt et al. 2008). Chacune des chaînes composant le récepteur sont composées d'une portion variable (V), d'une section constante (C), d'une région transmembranaire (Tm) puis d'une queue cytoplasmique (**Figure 3**)(Rudolph, Stanfield, et Wilson 2006; Kindt et al. 2008). Cette structure est issue de la recombinaison des segments des chaînes α et β qui a lieu lors de l'éducation thymique. Quant à l'interaction entre le TCR et le complexe pCMH, elle s'effectue par l'intermédiaire de régions déterminant la complémentarité (CDRs) situées dans les portions hypervariable du récepteur de chaque chaîne (Lodish 2005; Rudolph, Stanfield, et Wilson 2006). Les séquences des régions hypervariables CDR1 et CDR2 sont constantes pour chaque type de chaîne et sont directement encodées par les régions V (Garcia et Adams 2005). La région hypervariable CDR3, quant à elle, varie de façon presque illimitée et dicte la spécificité du TCR pour son peptide (Garcia et Adams 2005; Rudolph, Stanfield, et Wilson 2006).

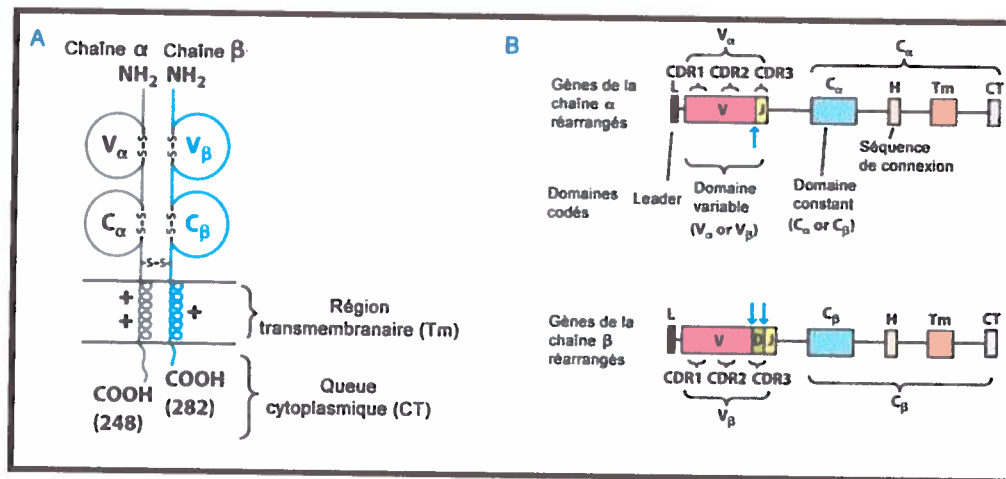


Figure 3: Structure des domaines et des gènes d'un TCR $\alpha\beta$

(Adapté de (Kindt et al. 2008))

Cette interaction entre le TCR et les complexes pCMH s'effectue à l'aide d'une affinité relativement faible ($\sim 1\text{-}100\ \mu\text{M}$) (Rudolph, Stanfield, et Wilson 2006). De plus, la reconnaissance du complexe pCMH et la signalisation qui s'en suit s'effectue dans un environnement localisé de la cellule appelé synapse immunologique et requiert la présence des co-récepteurs CD3, CD4 ou CD8 ainsi que d'autres récepteurs de co-stimulation (Rudolph, Stanfield, et Wilson 2006).

Le co-récepteur CD3 représente le module de signalisation du TCR. Ce dernier est composé des sous-unités δ , ϵ , γ et ζ qui sont associées de façon non covalente afin de former l'homodimère $\text{CD3}\zeta\zeta$, et les hétérodimères $\text{CD3}\epsilon\delta$ et $\text{CD3}\epsilon\gamma$ (Koning, Maloy, et Coligan 1990; Manolios et al. 1991; Call et Wucherpfennig 2005) (**Figure 4**). L'interaction entre les différents dimères composant le CD3 et le TCR s'effectuerait par l'intermédiaire des résidus transmembranaires chargés (Call et al. 2002). Un total de neuf résidus (une aspartate et une lysine dans la chaîne α , une lysine dans la chaîne β , une aspartate dans les chaînes $\text{CD3}\epsilon, \gamma, \zeta$ et une glutamate dans la chaîne $\text{CD3}\delta$) conservés et chargés présents dans les segments transmembranaires permet le maintien des sous-unités du complexe (Call et al. 2002; Call et Wucherpfennig 2005). Toutefois, d'autres études suggèrent l'intervention d'une cavité formée par une boucle FG dans le domaine $\text{C}\beta$ du TCR $\alpha\beta$, et le repliement de type immunoglobuline des chaînes $\text{CD3}\epsilon$ et $\text{CD3}\gamma$ (Wang et al. 1998; Kim et al. 2000). À la suite de l'activation du complexe TCR-CD3 lors de son interaction avec un complexe pCMH reconnu, le signal sera transmis à l'intérieur de la cellule par

l'intermédiaire de la phosphorylation des tyrosines contenues dans les motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) retrouvés sur les queues cytoplasmiques des sous-unités CD3 (Pitcher et van Oers 2003). Ces phosphorylations s'effectueront à l'aide des kinases de la famille Src (Lck et Fyn) (Pitcher et van Oers 2003).

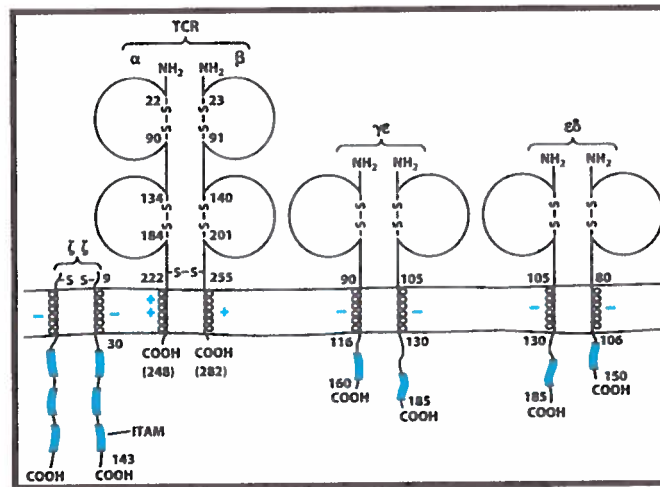


Figure 4: Complexe TCR - CD3

Adapté de (Kindt et al. 2008)

B. Éducation thymique

La grande diversité des TCR provient du réarrangement de leurs sections variables, se produisant dans le thymus. Durant leur développement, les thymocytes interagissent avec une variété de complexes pCMH du soi exprimés à la surface des TEC ainsi que de macrophages et de DC (Kosmrlj et al. 2008). Les thymocytes seront alors soumis à un processus de sélection du répertoire. La sélection positive permettra la maturation des thymocytes possédant une faible affinité pour les pCMH présents dans le thymus, permettant ainsi la restriction au CMH du soi (Tanchot et al. 1997; Goldrath et Bevan 1999; Starr, Jameson, et Hogquist 2003; von Boehmer et al. 2003; Werlen et al. 2003). Bien qu'il existe chez l'homme plus de 800 allèles de CMH I et 600 allèles de CMH II, la restriction du répertoire de cellules T d'un individu s'effectue en fonction des 6 CMH I et 8 CMH II pouvant être exprimés chez un individu (Janeway 2003). La sélection négative, quant à elle, éliminera les cellules possédant une affinité trop élevée pour les pCMH présents dans le thymus et possédant ainsi un potentiel auto-réactif trop important (Matzinger, Zamoyska, et

Waldmann 1984; Rammensee et Bevan 1984; Kappler, Roehm, et Marrack 1987; Kisielow et al. 1988; Viret et Janeway 1999).

1. Stades de développement des thymocytes.

Au cours de leur maturation, les thymocytes passent par différents stades de différenciation. Ces stades sont caractérisés par l'expression de différentes protéines membranaires telles que CD4, CD8, CD25 et CD44 (Starr, Jameson, et Hogquist 2003). Lors de leur arrivée dans le thymus par la jonction cortico-médulaire, les précurseurs de cellules T n'expriment pas de TCR ou de co-récepteurs telles que CD4 ou CD8 et sont donc appelés double négative (DN) (Starr, Jameson, et Hogquist 2003; Kindt et al. 2008). Puis au cours de leur progression dans le cortex du thymus, les thymocytes passent du stade DN1 (CD44+/CD25-) au stade DN2 (CD44+/CD25+). L'expression des recombinaisons RAG-1 et RAG-2 est alors augmentée et le réarrangement des gènes de la chaîne β est amorcé (Schatz, Oettinger, et Baltimore 1989; Oettinger et al. 1990; Kindt et al. 2008). La recombinaison s'effectue sur l'allèle présent sur le premier chromosome jusqu'à l'obtention d'un réarrangement fonctionnel. Dans le cas où aucun réarrangement ne peut être fonctionnel, l'allèle situé sur le second chromosome est réarrangé (Krangel 2003; Dudley et al. 2005). Toutefois, un mécanisme de régulation appelé exclusion allélique, veille à ce qu'un seul allèle de la chaîne β soit généralement exprimé (Khor et Sleckman 2005). Bien que son mécanisme d'action soit encore à l'étude, des travaux semblent indiquer l'existence d'un signal d'inhibition transmis par le complexe pT α /TCR β (Aifantis et al. 1997). Le stade DN3 (CD44-/CD25+) est atteint lorsque les thymocytes arrivent à la zone subcapsulaire du thymus. C'est à ce stade que nous observons les produits protéiques des réarrangements de la chaîne β dans le cytoplasme (Kindt et al. 2008). De plus, à ce stade de développement, nous pouvons observer la divergence des populations $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ (Starr, Jameson, et Hogquist 2003). À la suite de ce réarrangement, nous observons chez les cellules T $\alpha\beta$ l'expression d'un pré-TCR constitué de l'assemblage de la chaîne β nouvellement synthétisée et la chaîne invariante pré-TCR α (pT α) (Groettrup et al. 1993; Saint-Ruf et al. 1994; Starr, Jameson, et Hogquist 2003). Les cellules qui reçoivent le signal permettant leur survie, procèdent au réarrangement de leur chaîne α et diminuent leur expression de CD25 pour entrer dans le stade DN4 (CD44-/CD25-) (Fehling et al. 1995; von Boehmer et Fehling 1997; Starr, Jameson, et Hogquist 2003; Kindt et al. 2008). Par la

suite, les cellules entrent en phase de prolifération et expriment les co-récepteurs CD4 et CD8, qui caractérisent le stade double positif (DP) (Starr, Jameson, et Hogquist 2003). Les cellules DP sont alors les premières populations à exprimer un TCR $\alpha\beta$ à leur surface (Hernandez-Munain, Sleckman, et Krangel 1999). C'est alors à ce stade que les thymocytes sont soumis aux processus de sélection positive et négative. Puis de façon inhérente aux processus de sélections, les cellules se différencient en simple positive (SP) CD4⁺ ou CD8⁺, puis sortiront du thymus.

2. Recombinaison VJ, VDJ et variabilité

Ce processus de réarrangement est très similaire à celui observé dans le réarrangement des gènes d'immunoglobuline des cellules B. Au cours de leur développement, les thymocytes vont réarranger en premier lieu leur chaîne β puis en second lieu leur chaîne α . Alors que la chaîne α ne comporte que des segments V et J, la chaîne β comporte des segments V, D et J apportant ainsi une diversité supplémentaire (**Figure 5**). Des séquences signal de reconnaissance conservées (RSS) encadrent chacun des segments géniques V, D, J et vont permettre d'effectuer la recombinaison (Oettinger et al. 1990; McBlane et al. 1995; Grawunder, West, et Lieber 1998). Les RSS sont des séquences palindromiques constituées d'heptamère et de nonamère espacés par 12 ou 23 paires de bases (Early et al. 1980; Tonegawa 1983; Kindt et al. 2008). La recombinaison est restreinte à la règle 12/23 pb (ou un tour / deux tours d'ADN) car elle n'est possible qu'entre deux séquences RSS ne possédant pas la même longueur (Grawunder, West, et Lieber 1998). Après la liaison des RAG-1 et RAG-2 aux sites RSS situés entre les segments à joindre (V-J ou D-J), ces enzymes coupent l'un des brins d'ADN, catalysent la formation d'un joint entre les segments codants et produisent une boucle de matériel excisé appelée 'joint signal' (Grawunder, West, et Lieber 1998; Kindt et al. 2008).

Cette jonction entre les sections codantes laisse la place à deux mécanismes augmentant la variabilité de la région CDR3. Lors de la formation de ce joint, les recombinases vont cliver un seul brin et induire la formation d'une épingle à cheveux (Kindt et al. 2008). Par la suite, des endonucléases vont cliver cette structure en épingle à cheveux. Ce clivage a parfois lieu de telle sorte qu'il laisse un court brin d'ADN simple à l'extrémité de la séquence codante, induisant alors l'ajout de nucléotides complémentaires. Cet ajout de nucléotides est appelé addition P (Kindt et al. 2008). De plus, la désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT) est impliquée

dans l'ajout d'un maximum de 6 nucléotides non codés par les segments géniques et qui sont insérés à chaque jonction (Kindt et al. 2008).

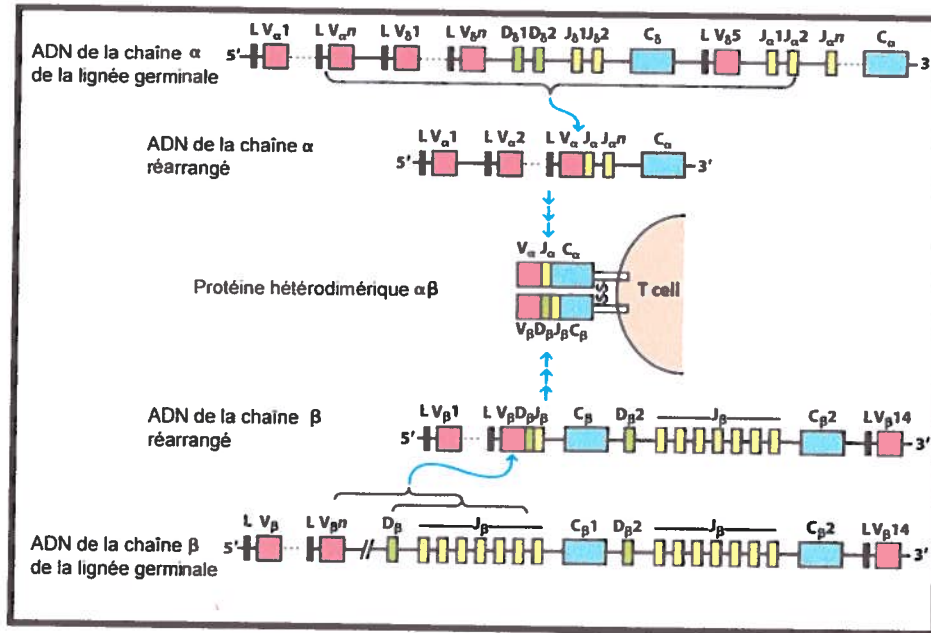


Figure 5: Réarrangement des gènes codant pour le récepteur des cellules T $\alpha\beta$.

Adapté de (Kuby et al. 2001)

3. Mécanismes des sélections positive et négative

Lors de la maturation des thymocytes, deux processus importants vont forger le futur répertoire des TCR $\alpha\beta$ exprimés à la surface des cellules T : la sélection positive forgeant la restriction au soi et la sélection négative façonnant la spécificité du répertoire.

a) Sélection positive

La sélection positive, qui a lieu dans la portion corticale du thymus, a pour fonction de conserver les cellules T exprimant un TCR $\alpha\beta$ capable d'interagir avec des complexes pCMH du soi et donc de créer un répertoire de cellules T restreint au soi et utile pour l'individu (Starr, Jameson, et Hogquist 2003). Lors de cette dernière, les thymocytes DP entrent en contact avec les TEC et reçoivent un signal de survie lorsque le TCR est apte à reconnaître le complexe pCMH présenté avec une affinité appropriée. En absence de ce signal de survie, les thymocytes entrent en apoptose. Bien que le mécanisme ne soit pas encore clairement identifié, certaines protéines ont été identifiées comme jouant un rôle dans la sélection positive telles que la sérine protéase MT-SP1 (Mouse type II membrane serine protease) et la BMP (Bone

morphogenetic protein) (Kim et al. 1999; Takagi, Harada, et Ishii 2001; Graf et al. 2002; List et al. 2002). De plus, plusieurs kinases des familles Src et Syk se sont avérées essentielles à la signalisation impliquée dans la sélection positive (Starr, Jameson, et Hogquist 2003).

Bien que la reconnaissance du complexe pCMH par le TCR soit indispensable à la sélection positive, le nombre et la nature des peptides impliqués restent controversés (Starr, Jameson, et Hogquist 2003). Certaines expériences réalisées à l'aide de peptides antagonisant des cellules T matures, démontrèrent leur capacité à induire leur sélection positive (Hogquist et al. 1994; Jameson, Hogquist, et Bevan 1994; Smyth et al. 1998; Stefanski et al. 2001). Ces travaux, à l'aide de peptides antagonistes, ont argumenté en faveur d'un modèle qualitatif où la qualité du signal transmis pouvait induire cette sélection positive. Ce modèle qualitatif fut aussi supporté par les travaux démontrant que l'interaction avec des ligands peptidiques sous-optimaux pouvait transmettre un signal intracellulaire distinct en variant le patron de phosphorylation de la chaîne CD3 γ et en perturbant l'activité de ZAP-70 (Sloan-Lancaster et al. 1994). Toutefois, d'autres travaux démontrèrent que la présence de peptides antagonistes ne permettait pas l'établissement d'une sélection positive ou diminuait grandement son importance (Spain et al. 1994; Williams et al. 1996; Basu, Williams, et Allen 1998; Levelt et al. 1998). Finalement, d'autres travaux ont démontré l'absence de spécificité du peptide impliqué dans la sélection positive car la séquence de ce dernier ne semble pas reliée au peptide antigénique (Pawlowski et al. 1996; Ignatowicz et al. 1997; Nakano et al. 1997; Starr, Jameson, et Hogquist 2003).

Alors que les précédents travaux eurent lieu à partir de TCR transgéniques et de peptides synthétiques, des travaux ont permis d'identifier des peptides naturels permettant l'induction de la sélection naturelle. Les peptides F5 et H-Y démontrèrent leurs capacités à induire la sélection positive des cellules présentant un TCR restreint au CMH I, mais uniquement lorsque ces derniers furent présents en très forte concentration (Hu et al. 1997; Ober et al. 2000). De plus, des travaux passant au crible les peptides extraits de CMH thymique K^b n'ont permis d'identifier qu'un seul peptide du soi possédant la capacité d'induire la sélection positive dans des thymocytes TCR transgéniques N15 (Sasada et al. 2001). Ces travaux nous suggèrent donc que les peptides du soi capables de promouvoir la sélection positive, sont rares et possèdent une faible affinité pour les TCR (Starr, Jameson, et Hogquist 2003).

b) Sélection négative

La sélection négative, quant à elle, élimine les thymocytes possédant une haute affinité pour un complexe pCMH rencontré dans le thymus. Le stade précis durant lequel ce mécanisme prend place reste encore contesté. Certains modèles transgéniques tentent à démontrer une délétion clonale précoce au stade double positive, toutefois d'autres travaux ont démontré que les thymocytes simples positifs retrouvés dans la médula pouvaient aussi être éliminés (Swat et al. 1993; Kishimoto et Sprent 1997; Sebzda et al. 1999). Certains auteurs ont donc avancé que le stade où s'effectue la sélection négative pouvait être fonction de l'avidité ou de l'affinité du TCR pour le ligand rencontré. Le degré d'expression des TCR $\alpha\beta$ des thymocytes DN étant inférieur à celui exprimé par les cellules SP, une stimulation plus forte du TCR des DN que celle des SP serait donc requise (Oehen et al. 1996; Sant'Angelo et Janeway 2002). Toutefois, ces résultats font encore l'objet de débats (Starr, Jameson, et Hogquist 2003).

Bien que la sélection thymique joue un rôle important dans l'élimination des cellules T possédant un fort potentiel auto-réactif, il a été démontré qu'elle joue aussi un rôle important en façonnant le répertoire de cellules T (Huseby et al. 2005). Certains travaux ont évoqué l'existence d'une certaine co-évolution entre les gènes V des TCR et la structure des CMH, cette co-évolution permettant de coder dans la séquence germinale des sections des segments V une haute affinité pour les CMH (Zerrahn, Held, et Raulet 1997; Turner et al. 2006). Cette hypothèse fut renforcée par des travaux effectués par Huseby et collaborateurs, démontrant qu'en absence de sélection négative, le répertoire de cellules T engendré induit davantage de réactions croisées envers différents complexes pCMH (Huseby et al. 2005). De récents travaux de cristallographies, analysant les réactions croisées observées chez certains TCR pour un même complexe pCMH, ont aussi permis d'appuyer ce concept de co-évolution de l'interaction TCR-pCMH en soulignant que les caractéristiques conservées de cette interaction imposaient le positionnement en diagonale du TCR par rapport au CMH (Dai et al. 2008). De plus, certains travaux estiment entre 5 et 20% le ratio de thymocytes pouvant reconnaître les différents allèles de CMH exprimés chez l'individu avant leur sélection thymique, ce qui est nettement supérieur à ce que des projections reposant sur l'existence de séquences aléatoires de TCR pourraient engendrer (Merkenschlager et al. 1997; Zerrahn, Held, et Raulet 1997). Cependant, cette interaction intrinsèque entre le TCR et le CMH est probablement de faible

affinité et peut être modulée, positivement ou négativement, par les chaînes latérales du peptide lié (Wang et Reinherz 2002).

L'importance des TEC dans le processus de sélection négative fut mise en évidence lors des études effectuées sur des souris déficientes pour le gène *AIRE*. Ces souris possèdent la caractéristique de réduire l'expression des antigènes périphériques dans les TEC de la médula (Anderson et al. 2002). Il en résulte une baisse importante de la sélection négative et l'augmentation de la susceptibilité aux maladies auto-immunes (Liston et al. 2004). De plus, il a été démontré que les DC possèdent la capacité de capturer les antigènes produits par les TEC et de les présenter dans des contextes de CMH de classe I et II, permettant ainsi la sélection négative des populations de thymocytes restreintes au CMH de classe II (Gallegos et Bevan 2004).

Plusieurs travaux ont avancé l'hypothèse que l'intensité du signal transmis, suite à l'interaction du TCR avec le complexe pCMH est la clef permettant d'induire la sélection positive et négative. Ainsi, une augmentation du signal transmis par le complexe TCR/CD3 permet d'observer une augmentation de la sélection négative (Thien et al. 2005; Tran et al. 2005), alors que l'inhibition des composantes impliquées dans la transduction du signal TCR/CD3 telles que ZAP-70 et LAT induit un affaiblissement de la sélection négative (Sakaguchi et al. 2003; Sommers et al. 2005). Toutefois, les peptides impliqués dans la sélection positive et négative induisent des altérations conformationnelles du récepteur TCR identique (Gil et al. 2005). La différenciation entre les deux signaux s'effectuerait donc davantage au niveau de la cinétique de signalisation qu'au niveau conformationnel (Siggs, Makaroff, et Liston 2006). La liaison de ligands de haute affinité aux TCR permettrait soit la stimulation d'un plus grand nombre de TCR simultanément, soit la stimulation du même nombre mais sur une période de temps plus longue (Siggs, Makaroff, et Liston 2006).

IV. Spécificité du TCR.

Lors de l'éducation des cellules T dans le thymus, les cellules sont sélectionnées de façon à obtenir un répertoire de cellules T essentiellement restreint aux CMH de l'individu et non auto-réactif. Toutefois, les processus d'alloréactivité vont impliquer une fréquence de précurseurs de cellules T alloréactives 100 à 1000 fois plus élevée que celle impliquée dans une réponse dite conventionnelle (Wilson et Blyth 1968; Lindahl et Wilson 1977; Sherman et Chattopadhyay 1993; Suchin et al. 2001; Felix et Allen 2007). Plusieurs hypothèses ont donc été soulevées afin d'expliquer cette fréquence particulièrement élevée impliquée dans les phénomènes d'alloréactivité.

A. Premières hypothèses : alloréactivité et l'implication des allopeptides

Le répertoire de cellules T étant de prime abord sélectionné en fonction de la capacité à interagir avec les pCMH du soi, il est donc surprenant d'observer une si grande fréquence des précurseurs de cellules T possédant la capacité d'interagir avec des pCMH étrangers (Felix et Allen 2007).

Afin d'expliquer ce phénomène, plusieurs modèles furent proposés. Chacun d'eux se reposant sur l'existence d'une dégénérescence du TCR. Cependant, bien que les uns accordaient une importance toute particulière à l'allopeptide, les autres soutenaient que le peptide ne tenait qu'un rôle accessoire.

Proposée par Matzinger en 1977, l'hypothèse des multiples complexes binaires reposait sur une reconnaissance des complexes [peptide du soi / CMH] par les cellules T alloréactives (Matzinger et Bevan 1977). Les CMH possèdent la particularité de pouvoir fixer plusieurs peptides différents. Ainsi, après une greffe, divers peptides du soi vont pouvoir se lier aux molécules de CMH allogéniques. Chacune de ces combinaisons pourrait alors être reconnue par un clone lymphocytaire T spécifique et différent. C'est cette diversité de clones activés qui induirait cette réaction immunitaire intense contre le greffon et l'observation d'une si haute fréquence de précurseur alloréactifs.

Quant à l'hypothèse de la haute densité des déterminants, elle fut avancée pour la première fois en 1984 par Bevan (Bevan 1984). Cette théorie s'appuyait sur le principe que les cellules T alloréactives reconnaissaient principalement des épitopes qui étaient contenus directement dans les CMH allogéniques. Dans ce concept, la

présence de peptides était non indispensable. Les CPA, possédant un nombre particulièrement élevé de CMH à leur surface, possèdent un grand nombre de ligands potentiels qui peuvent interagir avec des cellules T alloréactives (Bevan 1984). Cette situation permettrait une augmentation de 100 à 1000 fois du nombre de ligands potentiels, lorsque comparée à une voie de présentation classique nécessitant une internalisation du peptide (Dupont, Herbert, et Warrens 2003). Ce modèle permettait donc de concevoir que les cellules T ayant une affinité faible ou intermédiaire puissent être activées alors que la voie classique de présentation ne permet que l'activation des cellules T de fortes affinités.

B. Un TCR polyspécifique

Depuis l'émergence de ces deux concepts, l'évolution des techniques utilisées pour l'étude des interactions entre le TCR et les complexes pCMH syngéniques ou allogéniques a permis une meilleure compréhension de ce phénomène. La résolution de structures cristallographiques de plusieurs complexes pCMH, conjuguée à des techniques telles que le balayage de résidus par substitution d'alanine (alanine-scanning mutagenesis), les analyses de thermodynamique ainsi que la spectroscopie par résonance magnétique, nous ont permis d'explorer ces interactions sous un autre angle.

1. Interactions TCR-pCMH

À ce jour, 25 structures cristallographiques de complexe $\text{TCR}\alpha\beta/\text{pCMH}$ ont été résolues (**Tableau 1**). Bien que ces structures nous aient permis d'apprendre beaucoup sur ces interactions, plusieurs interrogations restent encore à élucider. Ainsi les bases de l'alloréactivité ainsi que la restriction au CMH sont encore étudiées. Un total de 19 structures impliquant des CMH I furent analysées alors que seulement 6 impliquant des CMH II le furent (**Tableau 1**).

Tableau 1: Liste des structures de cristallographies résolues des complexes TCR $\alpha\beta$ /pCMH entre 1996 et 2007.

CMH	Complexe (TCR/pCMH)	Type de reconnaissance	Peptide	Activité peptidique	Réf.
CMH I	2C/H-2K ^b /dEV8	Conventionnelle	EQYKFYSV	Agoniste faible	(Garcia et al. 1998)
	2C/H-2K ^b /SIYR	Conventionnelle	SIYRYGYL	Super-agoniste	(Degano et al. 2000)
	2C/H-2K ^b /dEV8	Alloréactive	EQYKFYSV	Faible agoniste	(Luz et al. 2002)
	2C/H-2L ^d /QL9	Alloréactivité	QLSPFPFDL	Agoniste	(Colf et al. 2007)
	scBM3.3/H-2K ^b /pBM1	Alloréactive	INFDFTI	Agoniste	(Reiser et al. 2000)
	scBM3.3/H-2K ^b /VSV8	Alloréactive	RGYVYQGL	Agoniste	(Reiser et al. 2003)
	scKB5-C20/H-2K ^b /pKB1	Alloréactive	KVITFIDL	Agoniste	(Reiser et al. 2002)
	B7/HLA-A2/Tax	Conventionnelle	LLFGYPVYV	Agoniste fort	(Ding et al. 1998)
	A6/HLA-A2/Tax	Conventionnelle	LLFGYPVYV	Agoniste fort	(Garboczi et al. 1996)
	A6/HLA-A2/TaxP6A	Conventionnelle	LLFGYAVYV	Antagoniste faible	(Ding et al. 1999)
	A6/HLA-A2/TaxV7R	Conventionnelle	LLFGYPRYV	Agoniste faible	(Ding et al. 1999)
	A6/HLA-A2/TaxY8A	Conventionnelle	LLFGYPVAV	Antagoniste faible	(Ding et al. 1999)
	JM22/HLA-A2/MP	Conventionnelle	GILGFVFTL	Agoniste	(Stewart-Jones et al. 2003)
	1G4/HLA-A2/ESO9V	Conventionnelle	SLLMWITQV	Agoniste	(Chen et al. 2005)
	1G4/HLA-A2/ESO9C	Conventionnelle	SLLMWITQC	Agoniste	(Chen et al. 2005)
	ELS4/EBV/HLA-B*3501	Conventionnelle	EPLPQGQLTAY	Agoniste	(Tynan et al. 2007)
	AHIII12.2/HLA-A2.1/p1049	Xénoréactive	ALWGFFPVL	Agoniste	(Buslepp et al. 2003)
	SB27/HLA-B3508/EBV	Conventionnelle	LPEPLPQGQLTAY	Agoniste	(Tynan et al. 2005)
	LC13/HLA-B8/FLR	Conventionnelle	FLRGRAYGL	Agoniste	(Kjer-Nielsen et al. 2003)
CMH II	scD10/I-A [*] /CA	Conventionnelle	HRGAIEWEGIESG	Agoniste	(Reinherz et al. 1999)
	HA1.7/HLA-DR1/HA	Conventionnelle	PKYVKQNTLKLAT	Agoniste	(Hennecke, Carfi, et Wiley 2000)
	HA1.7/HLA-DR4/HA	Alloréactive	PKYVKQNTLKLAT	Agoniste	(Hennecke et Wiley 2002)
	Ob.1A12/HLA-DR2b/MBP	Auto-réactive	ENPVVHFFKNIVTPR	Agoniste	(Hahn et al. 2005)
	sc172.10/I-A [*] /MBP	Auto-réactive	ASQKRPSQRH	Agoniste	(Maynard et al. 2005)
	3A6/HLA-DR2a/MBP	Auto-réactive	VHFFKNIVTPRTP	Agoniste	(Li et al. 2005)

Modifié de Rudolph *et al.* 2006 et Felix *et al.* 2007

a) Premier cristal TCR murin

La première structure murine d'un TCR publiée est celle du TCR 2C. Le système du TCR 2C a apporté beaucoup à notre compréhension de ces interactions. Ce dernier possède la caractéristique d'être alloréactif contre le CMH I H-2L^d et est restreint au CMH I H-2K^b (Udaka, Tsomides, et Eisen 1992; Tallquist et Pease 1995).

De plus, les peptides impliqués dans ces réactions ont été identifiés. Ce TCR reconnaît donc le peptide dEV8 (EQYKFYSV) lorsque présenté dans un contexte H-2K^b et les peptides QL9 (QLSPFPFDL) et p2Ca (LSPFPFDL) lorsque présentés dans un contexte H-2L^d (Udaka, Tsomides, et Eisen 1992; Udaka et al. 1993; Sykulev et al. 1994). De plus, bien que dEV8 soit un agoniste faible lorsque présenté dans un contexte H-2K^b, il devient un agoniste bien plus fort lorsque présenté par l'allèle muté H-2K^{bm3} (Tallquist, Yun, et Pease 1996). Le CMH I H-2K^{bm3} est un mutant naturel de l'haplotype H-2K^b dans lequel les résidus Asp77 et Lys89 de la chaîne lourde du CMH I sont mutés et est un allo-antigène du TCR 2C lorsqu'il présente le peptide dEV8 (Sha et al. 1990). Cette alloréactivité fut attribuée à la mutation du seul résidu Asp77 par une sérine (Pullen et al. 1989; Sha et al. 1990).

L'analyse de la structure cristalline 2C/H-2K^b – dEV8 a permis de confirmer l'orientation diagonale du TCR au-dessus de la niche peptidique ainsi que la position centrale des régions CDR3 α et CDR3 β (Garcia, Teyton, et Wilson 1999). De plus, les régions CDR1 α / β sont principalement en interaction avec les extrémités du peptide ainsi que le CMH. Quant aux régions CDR2, elles sont principalement en interaction avec les hélices α du CMH (Garcia, Teyton, et Wilson 1999). Les études sur les complexes 2C/H-2K^b – dEV8 et H-2L^d – QL9 nous ont indiqué que les hélices α des CMH sont fortement impliquées dans la reconnaissance du complexe pCMH (Manning et al. 1998; Garcia, Teyton, et Wilson 1999).

L'étude des sites de contacts entre le TCR 2C et le pCMH a permis d'observer que les résidus de contacts contribuent de façon égale à la liaison et favorise donc l'hypothèse du modèle dit de balayage ou 'scanning model' (Garcia, Teyton, et Wilson 1999). Ce modèle suggère que l'interaction nécessite une énergie de liaison suffisante entre la chaîne lourde du CMH et du TCR afin de promouvoir son attachement et la lecture du peptide contenu dans la niche. Un peptide permettant une stabilisation du complexe, grâce à un nombre suffisant de résidus de contacts adéquats, serait susceptible d'induire une signalisation (Valitutti et al. 1995).

Le modèle 2C fut aussi le premier à comparer les structures liées et non liées. Il a donc été observé que la liaison du TCR 2C au complexe pCMH induisait un grand changement conformationnel des régions CDR1 α , CDR3 α et un changement conformationnel de moindre ampleur de la région CDR3 β (Garcia, Teyton, et Wilson 1999). Ces régions interagissant toutes avec le peptide, ces changements

conformationnels illustrent la flexibilité du TCR et sa capacité à répondre à différents pCMH (Ignatowicz, Kappler, et Marrack 1996; Pawlowski et al. 1996; Bevan 1997).

Quant à l'étude de l'alloréactivité du TCR 2C contre le CMH I H-2L^d, elle s'effectua à l'aide des peptides p2Ca et QL9. Elle a permis de conclure que cette alloréactivité est issue d'une forme de mimétisme moléculaire (Garcia, Teyton, et Wilson 1999). Les peptides liant le CMH I H-2L^d (p2Ca et QL9), reproduisant ici le contexte permettant l'alloréactivité induite par l'Asp 77 muté dans le H-2K^{bm3} (Garcia, Teyton, et Wilson 1999).

b) Première structure cristalline TCR/pCMH humain

Le complexe TCR A6/HLA-A2-Tax fut le premier complexe TCR/pCMH I humain caractérisé (Garboczi et al. 1996). Le TCR A6 fut isolé d'un patient, infecté par le virus humain lymphotrope-T de type 1 (HTLV-1), dont une grande proportion de ses CTL circulants étaient dirigés contre le peptide Tax. L'analyse de ce complexe a permis de révéler l'orientation en diagonale du TCR par rapport à la niche peptidique (Garboczi et al. 1996). La position et l'interaction des régions CDR1 α et CDR2 α sont sensiblement les mêmes que celles observées dans le complexe 2C. Toutefois, contrairement au complexe 2C, seule la région CDR3 de la chaîne β interagit avec le peptide alors que les régions CDR1 β et CDR2 β n'interagissent pas avec la surface du complexe pCMH (Garcia, Teyton, et Wilson 1999). Le TCR A6 possède un nombre bien plus élevé d'interactions avec le peptide Tax que le TCR 2C avec le peptide dEV8. Ceci est dû à la région centrale du CMH I HLA-A2 qui est surélevée et permet la présentation du peptide Tax de façon à ce que ce dernier soit davantage à l'extérieur de la niche peptidique (Madden, Garboczi, et Wiley 1993), ce qui permet de spéculer que la plus grande immunogénécité de Tax peut être attribuable au plus grand nombre d'interactions TCR-peptides observées dans le modèle A6 (Garcia, Teyton, et Wilson 1999).

c) Autres structures TCR/pCMH

Au fil des ans, plusieurs autres structures ont été résolues et ont permis de confirmer certaines observations effectuées sur le TCR 2C (**Tableau 1**). Les analyses réalisées sur les TCR 2C, KB5-C20, LC13 et D10 ont révélé l'existence d'une importante différence conformationnelle entre les structures liées et non liées (Garcia et al. 1998; Hare et al. 1999; Reinherz et al. 1999; Reiser et al. 2002; Kjer-Nielsen et al. 2003). Toutefois, les changements conformationnels importants se sont limités aux

boucles CDR3 α/β . Quant aux boucles CDR1 et CDR2, elles subissent un mouvement en bloc ou des changements conformationnels modérés (Housset et Malissen 2003). De plus, tel que le démontre les travaux sur le TCR A6, les modifications conformationnelles ne se propageant pas hors du site de liaison, il est donc difficile de corrélérer ces observations au modèle de signalisation TCR postulant que l'interaction du TCR induit un changement conformationnel responsable de la signalisation (Ding et al. 1999).

De plus, bien qu'aucun patron de cristallographie ne soit disponible pour les constructions HLA-A2-flu et 2B4-MCC-E^k, des analyses thermodynamiques effectuées sur celles-ci, suggèrent que les TCR et/ou les complexes pCMH possèdent une certaine flexibilité permettant les ajustements conformationnels qui sont requis lors de l'interaction (Boniface et al. 1999; Willcox et al. 1999). Cette flexibilité des boucles CDR3, conjuguée à la variabilité des angles de pairage entre les segments V α -V β semblent donc faciliter l'adaptation du TCR à la surface pCMH (Willcox et al. 1999; Housset et Malissen 2003).

Plusieurs patrons de cristallographie permirent d'observer que les régions conservées des boucles CDR1 et CDR2 interagissent principalement avec les hélices α des CMH, alors que la région CDR3 interagit principalement avec le peptide (Jorgensen et al. 1992; Garcia et al. 1996; Garcia et al. 1999; Garcia, Teyton, et Wilson 1999; Rudolph et Wilson 2002). Toutefois, bien que l'ensemble des complexes TCR/pCMH analysés présente une liaison du TCR formant une diagonale avec la niche peptidique du complexe pCMH, aucun site régissant cette interaction ne put être identifié dans les régions conservées des hélice- α des CMH afin d'expliquer ce phénomène (Ding et al. 1998; Garcia et al. 1998; Reiser et al. 2002).

Quant aux travaux sur le TCR BM3.3, ils permirent de caractériser cette apparente «dégénérescence» de la reconnaissance par le TCR et de comprendre comment cette flexibilité du site de liaison est exploitée dans les réactions croisées (Reiser et al. 2003). Le TCR BM3.3 possède la caractéristique de reconnaître les peptides pBM1 (INFDFNTI) et VSV8 (RGYVYQGL) lorsque ces derniers lui sont présentés dans un contexte de CMH I H-2K^b (Tableau 1) (Reiser et al. 2000). L'analyse de ce dernier a permis d'observer que le seul résidu indispensable à la reconnaissance et que partage les deux peptides est situé en position P6. L'asparagine présente à cette position dans le peptide pMB1 est substituée de façon homologue par

une glutamine dans le peptide VSV8 et leur présence sont toutes deux essentielles à la reconnaissance par le TCR (Guimezanes et al. 2001; Housset et Malissen 2003). Toutes les autres positions sont non conservées et affectent la liaison au TCR de façon positive ou négative selon la substitution. La flexibilité des boucles CDR3 α/β compensent alors pour la perte d'interaction (Housset et Malissen 2003). Cet exemple illustre donc bien ici comment l'interaction TCR-pCMH peut être à la fois spécifique et dégénérée (Reiser et al. 2003).

Le phénomène d'alloréactivité fut quant à lui exploré à l'aide des structures KB5-C20/H-2K^b/pKB1, BM3.3/H-2K^b/pBM1 et BM3.3/H-2K^b/VSV8 (**Tableau 1**) (Reiser et al. 2000; Reiser et al. 2002; Reiser et al. 2003). L'étude de ces structures a clairement démontré l'importance du peptide et de l'interaction avec ces résidus pour l'allo-reconnaissance de ces pCMH par ces TCR. Cependant, les structures cristallographiques de ces TCR en interaction avec les pCMH pour lesquels ils sont restreints n'étant pas encore disponibles, il était jusqu'à tout récemment impossible de comparer ces deux modes de reconnaissance (Housset et Malissen 2003). Toutefois, certains travaux tentèrent de démontrer que les TCR alloréactifs et peptides spécifiques interagissent avec la surface des allo-CMH à travers une géométrie similaire à celle rencontrée lors de leur sélection par les complexes pCMH du soi (Reiser et al. 2000). Puis, le co-cristal 2C/H-2L^d/GL9 fut résolu en 2007, permettant ainsi d'obtenir un premier modèle comparant la réaction d'alloréactivité ainsi que la réaction conventionnelle d'un même TCR (Colf et al. 2007). Ces travaux permirent de démontrer que cette réaction croisée, d'un TCR pour deux CMH (allogénique et conventionnel) pouvait survenir en absence de mimétisme moléculaire (Colf et al. 2007).

2. Alloréactivité et spécificité peptidique

Comme les modèles de Bevan (Bevan 1984) et de Matzinger (Matzinger et Bevan 1977) l'ont exposé, l'alloréactivité peut être expliquée d'une part par l'interaction entre le TCR et les résidus polymorphiques de CMH allogénique ou bien d'autre part par l'interaction entre le TCR et l'allopeptide lié dans le complexe pCMH allogénique. Ces modèles distincts contrastent toutefois avec le mode de reconnaissance conventionnel par lequel le TCR interagit autant avec le peptide qu'avec le CMH (Rudolph, Stanfield, et Wilson 2006).

Bien que certains exemples de cellules T allogéniques peptides-indépendants ont été relevés dans la littérature, ceux-ci demeurent toutefois de rares exceptions (Elliott et Eisen 1990; Smith et al. 1997; Felix et Allen 2007). La plupart des structures TCR-pCMH résolut à ce jour, semblent pour le moment indiquer que les TCR alloréactifs et conventionnels interagissent tous deux de façon similaire et nécessitent une interaction avec le peptide lié ainsi que le CMH (Felix et Allen 2007).

Plusieurs travaux ont permis de démontrer que l'alloréactivité est peptide spécifique, et ce pour les deux classes de CMH (Heath et al. 1991; Panina-Bordignon et al. 1991; Crumacker et al. 1992; Udaka, Tsomides, et Eisen 1992; Alexander-Miller et al. 1993; Malarkannan, Afkarian, et Shastri 1995; Weber et al. 1995; Tallquist, Yun, et Pease 1996; Obst et al. 1998; Mendiratta et al. 1999; Whitelegg et al. 2005; Pittet et al. 2006; Felix et Allen 2007). De plus certains travaux ont confirmé l'habileté de certains TCR alloréactifs à reconnaître, de façon hautement spécifique, plusieurs complexes pCMH allogéniques distincts (Guimezanes et al. 2001; Chen, Eisen, et Kranz 2003; Reiser et al. 2003; Felix et al. 2007; Mazza et al. 2007). D'autres travaux laissent aussi croire que la spécificité du peptide impliqué lors de réactions d'alloréactivité est fonction des similarités partagées entre les CMH du donneur et du receveur (Lechler et al. 1990; Obst et al. 2000; Felix et Allen 2007). Les peptides impliqués dans des réactions d'alloréactivité contre des CMH partageant de nombreuses similarités possèdent un haut degré d'homologie, tel que le démontrent les travaux sur le TCR HA1.7 (Hennecke et Wiley 2002). À l'inverse, il a été démontré que le peptide impliqué dans la réaction d'alloréactivité du TCR 2C contre le CMH murin H-2L^d est distinct de celui impliqué dans sa réaction conventionnelle avec le CMH H-2K^b (Chen, Eisen, et Kranz 2003). Les CMH murins H-2L^d et H-2K^b possédant 19 résidus polymorphiques distincts, la surface de leurs complexes pCMH s'en trouve largement altérée (Felix et Allen 2007). Cette différence est notamment observable par la divergence retrouvée dans l'angle de liaison du TCR avec la niche peptidique lors des réactions alloréactives et conventionnelles (Archbold, Macdonald et al. 2008). Ce lien observé, entre le nombre de résidus polymorphiques des CMH impliqués dans les réactions alloréactive et conventionnelle d'un TCR et la spécificité du peptidique de la réaction, tire son origine du fait que l'alloréactivité est liée à l'affinité que porte un TCR alloréactif pour la surface du complexe pCMH allogénique (Felix et Allen 2007). De plus, le polymorphisme de la niche peptidique

des CMH affecte le répertoire de peptides pouvant s'y lier ainsi que la conformation de la surface pCMH interagissant avec le TCR alloréactif (Felix et Allen 2007).

Bien que le nombre de résidus polymorphiques entre les CMH allogéniques et syngéniques soit important pour la spécificité peptidique des réactions alloréactives, il a été démontré que les similarités entre ces deux CMH sont aussi importantes pour l'incidence des réactions alloréactives. La sélection thymique positive permettant un enrichissement du répertoire de cellules T aptent à interagir avec les complexes pCMH du soi, favorise par le même fait la sélection d'un répertoire apte à reconnaître des CMH allogéniques ne présentant que peu de résidus polymorphiques (Rossjohn et McCluskey 2007; Archbold, Macdonald et al. 2008). Plusieurs travaux ont notamment démontré que la présence d'un ou deux résidus polymorphiques pouvait altérer le répertoire de peptides présentés ou la conformation de la surface présentée au TCR et de ce fait permettre l'allorecognition (Fleischhauer et al. 1990; Lopez et al. 1992; Herman et al. 1999; Luz et al. 2002; Macdonald et al. 2003). De plus, il a été démontré que dans certains cas l'alloréponse diminue avec l'augmentation du nombre de disparités entre les pCMH (Heemskerk et al. 2005; Claas et al. 2006). Enfin, d'un point de vue plus clinique, il a été observé que les transplantations de cellules souches hématopoïétiques possédant des CMH de classe I très divergeants de celui du receveur étaient acceptées, favorisant l'hypothèse selon laquelle le processus de sélection thymique limite la capacité des cellules T d'un individu à ne reconnaître que les CMH allogéniques possédant peu de disparités avec les CMH syngénique (Heemskerk et al. 2005; Heemskerk et al. 2007). Cette reconnaissance des complexes pCMH allogéniques présentant peu de disparités avec les CMH du receveur reflète le concept de mimétisme moléculaire préalablement observé chez certains TCR tel que le TCR 2C (Garcia, Teyton, et Wilson 1999).

3. Mimétisme moléculaire et polyspécificité

Ainsi, la grande majorité des TCR alloréactifs sont peptides spécifiques ou dépendants de peptides. Cependant, certains travaux ont déjà démontré que des TCR possédaient l'habileté de reconnaître plusieurs peptides non homologues présentés par le même CMH allogénique (Guimezanes et al. 2001; Felix et al. 2006). Chacune de ces combinaisons pCMH reconnue de façon spécifique par le TCR alloréactif étant distincte et unique, ce phénomène ne résulte donc pas d'un mimétisme moléculaire

mais bien d'une polyspécificité (Reiser et al. 2003; Felix et al. 2006; Felix et al. 2007; Mazza et al. 2007).

L'émergence de ce concept de polyspécificité a pris son envol lors des différents travaux portant sur des maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaque. Ce sont les travaux de Bhardway et collaborateurs qui en 1993 furent les premiers à noter une certaine «dégénéscence» de la reconnaissance de cellules T envers différents épitopes de la MBP (protéine basique de la myéline) (Bhardwaj et al. 1993). Puis, bien qu'alors présenté comme un mimétisme moléculaire, les travaux de Wucherpfennig et collaborateurs portant sur des cellules T spécifiques à la MBP (85-99) démontrèrent la capacité de ces cellules T à reconnaître des épitopes distincts et non homologues (Wucherpfennig et Strominger 1995). Ainsi, il a été démontré que le clone de cellules T Hy.1B11, spécifique à la séquence MBP(85-99) lorsque présenté dans un contexte de CMH II DQ1, est aussi activé par 2 peptides viraux (*Herpes simplex* et *Adénovirus* de type 12) ainsi qu'un peptide d'origine bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*) lorsque présentés dans le même contexte (Wucherpfennig et Strominger 1995) (Tableau 2).

Tableau 2: Spécificité du clone T Hy.1B11 contre des peptides présentés dans un contexte syngénique CMH II DQ1.

Source	Séquence
MBP(85-99)	ENPVVHFFKNIVTPR
<i>Herpes simplex</i>	FRQLVHFVRDFAQL
<i>Adénovirus</i> de type 12	DFEVVTFCLKDVLPEF
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DRLLMLFAKDVVSRN

Adapté de (Wucherpfennig et Strominger 1995)

Puis parallèlement à ces travaux, Evavold et collaborateurs publièrent en 1995 des résultats démontrant qu'il existait dans le répertoire de peptides endogènes plusieurs différents ligands possibles pour un même TCR (Evavold et al. 1995). Ceux-ci observèrent que la présence d'un faible nombre d'acides aminés conservés entre deux peptides non homologues pouvait conduire à deux séquences aptes à stimuler un même TCR, pourvu que le contexte des autres acides aminés était adéquat (Evavold et al. 1995). Ainsi lors de ces travaux, le clone de cellules T de type Th1 PL.17 fut activé par deux peptides ne partageant que 4 acides aminés entre eux. Les peptides NOS(205-216) et Hb(64-76), permirent l'activation de ce clone lorsque ces derniers furent présentés dans un contexte I-E^k (Evavold et al. 1995).

Le concept de polyspécificité fut renforcé dernièrement par les travaux de Cai et collaborateurs, publiés en 2007 (Cai et Hafler 2007). Ceux-ci démontrèrent que certaines cellules T CD4⁺ du répertoire normal d'un individu, possèdent la capacité de reconnaître plusieurs antigènes distincts (Cai et Hafler 2007). Le concept de polyspécificité pourrait donc bien pouvoir expliquer la haute fréquence de précurseur de cellules T alloréactives observée ainsi que plusieurs autres phénomènes telles que l'induction de réactions auto-immunes par des ligands exogènes microbiens (Wucherpfennig et al. 2007).

V. TCR 2.102

Tel que nous avons pu l'observer précédemment, plusieurs travaux tendent à démontrer que l'alloréactivité est un phénomène peptide spécifique ou peptide dépendant. De plus, d'autres études suggèrent la présence de peptides endogènes impliqués dans certaines réactions alloréactives. Ainsi, les travaux de Lombardi et collaborateurs, publiés en 1989, suggèrent que l'alloreconnaissance du clone de cellule T anti-DR1Dw1 est dépendante de la présentation d'un peptide endogène par le CMH de classe II DR1 (Lombardi et al. 1989). Puis en 1991, Demotz et collaborateurs publièrent des résultats suggérant que l'allo-CMH de classe II seul n'est pas suffisant pour activer le clone de cellule T alloréactif mais la présence d'un peptide du soi semble nécessaire (Demotz et al. 1991). Malgré l'apport de ces travaux, la contribution des peptides du soi dans les réactions alloréactives est encore mal définie. Peu de structures de complexes alloréactifs TCR\pCMH II ont été résolues par cristallographie (**Tableau 1**) et peu de modèles nous permettent pour le moment de comparer d'un point de vue moléculaire la reconnaissance conventionnelle et l'alloréactivité d'un même TCR.

Bien que le modèle du TCR 2C nous a permis d'obtenir les premières comparaisons des interactions moléculaires impliquées lors des réactions alloréactives et conventionnelles d'un même TCR (**Tableau 1**), ce dernier demeure non représentatif d'un point de vue physiologique. Le TCR 2C ayant été isolé en fonction de son alloreconnaissance de haute-affinité, à la suite de l'immunisation de souris exprimant l'haplotype H-2^b à l'aide de cellules présentant un CMH allogénique H-2^d, celui-ci comporte un important biais. Le modèle du TCR 2C se trouve donc à être davantage représentatif d'un contexte physiologique d'un individu déjà immunisé

contre ce complexe pCMH allogénique et où une sélection clonale a déjà poli l'affinité des TCR de cette population mémoire.

Toutefois, des travaux sur le TCR 2.102 semblent pouvoir nous donner l'opportunité d'obtenir un modèle permettant l'étude des réactions alloréactive et conventionnelle d'un même TCR et ce, dans des conditions se rapprochant davantage d'un contexte physiologique (Daniel, Grakoui, et Allen 1998; Daniel, Horvath, et Allen 1998; Felix et al. 2006). Le clone de cellules T exprimant le TCR 2.102 étant isolé en fonction de sa reconnaissance d'un peptide présenté dans un contexte syngénique (Lorenz et Allen 1988, 1989; Evavold et al. 1992), l'étude de son alloréactivité demeure plus représentative d'un point de vue physiologique.

A. Dualité du TCR 2.102

Le clone de cellules T 2.102 est spécifique au peptide Hb(64-76) lorsque présenté dans un contexte de CMH de classe II I-E^k et alloréactif au CMH de classe II I-E^p (**Figure 6**) (Lorenz et Allen 1988; Evavold et al. 1992; Daniel, Grakoui, et Allen 1998). Ce clone de cellules T fut obtenu suite à l'immunisation de souris (CE/J) exprimant le CMH II I-E^k à l'aide d'hémoglobine (Hb) de souris (CBA/J) exprimant un variant allélique différent des premières (Lorenz et Allen 1988). La spécificité du clone obtenu est dirigée contre les acides aminés 64 à 76 de l'allèle d mineur de la chaîne β de l'hémoglobuline de souris (Hb β^{dmineur}) (Lorenz et Allen 1988). Suite à l'obtention de ce clone T 2.102, un hybridome fut élaboré à l'aide du partenaire $\alpha\beta$ BW5147 (Evavold, Sloan-Lancaster, et Allen 1994). De plus, une lignée de souris transgéniques pour le clone de cellule T 2.102 fut élaborée à l'aide des souris C57BL/6 et B6.AKR (Grakoui et al. 1999).

Quant à l'alloréactivité du clone T 2.102 contre I-E^p, elle fut identifiée et publiée par Daniel et collaborateur en 1998 (Daniel, Grakoui, et Allen 1998). Lors de ces travaux, des splénocytes des souris P/J et B10.P furent utilisés. Bien que toutes deux expriment l'haplotype H-2^p, seule la lignée P/J exprime l'allèle Hb β^{dmineur} de l'hémoglobine murine (Daniel, Grakoui, et Allen 1998). Leurs résultats permirent donc de démontrer cette alloréactivité contre I-E^p, toutefois la présence ou l'absence de l'épitope Hb(64-76) de l'allèle Hb β^{dmineur} n'eut aucune influence sur cette réaction (Daniel, Grakoui, et Allen 1998). L'alloréactivité du clone T 2.102 contre I-E^p ne semble donc pas nécessiter la présence de Hb(64-76). Cependant, d'autres résultats

obtenus à l'aide des lignées cellulaires CH27 (lymphome de cellule B) et CHO (fibroblaste d'ovaire de hamster), transfectées à l'aide de constructions I-E^P αβ, suggèrent le caractère peptide-dépendant de l'alloréactivité du clone T 2.102 (Daniel, Horvath, et Allen 1998). Les CH27-E^P permettant de reconstituer l'alloréactivité du clone de cellules T 2.102, alors que les CHO-E^P en sont incapables, cela nous suggère que ces dernières sont incapables de présenter l'allopeptide en question (Daniel, Grakoui, et Allen 1998; Daniel, Horvath, et Allen 1998).

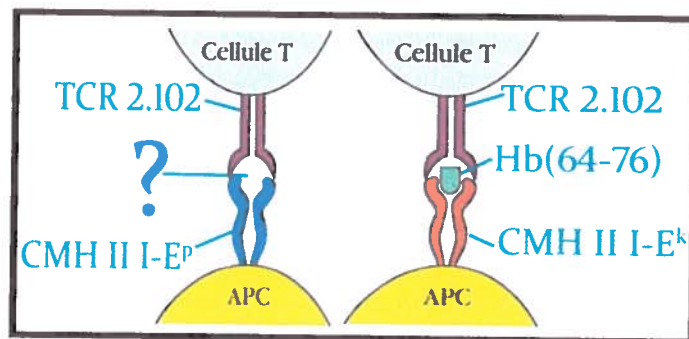


Figure 6: Restriction et alloréactivité du TCR 2.102

B. Identification d'allopeptide et TCR 2.102

L'identification d'un allopeptide dans le modèle du clone de cellule T 2.102 est facilité par le fait que le complexe syngénique I-E^k/Hb(64-76) est bien caractérisé et que sa structure moléculaire fut résolue par cristallographie (Lorenz et Allen 1988; Wettstein et al. 1991; Evavold et al. 1992; Fremont et al. 1996). Il fut observé que la reconnaissance de Hb(64-76) et la liaison au CMH I-E^k reposait essentiellement sur l'extrémité carboxylique de cette séquence, soit la région (69-76) de l'épitope (Figure 7) (Evavold et al. 1992). De plus, il fut observé que les positions 69, 71, 72, 73 et 76 avaient une importance toute particulière et la réponse obtenue était grandement affectée par la substitution à l'une de ces positions (Evavold et al. 1992). Alors que la position 71 semble particulièrement cruciale lors de l'interaction entre Hb(64-76) et I-E^k, les résidus 72, 73 et 76 ont quant à eux démontré leurs importances dans la reconnaissance par le TCR 2.102 (Evavold et al. 1992).

Cependant, bien que l'on connaisse le peptide impliqué dans la réponse conventionnelle du clone T 2.102, celui impliqué dans l'alloréactivité reste encore inconnu. Le motif de liaison à I-E^P fut défini à l'aide d'un modèle basé sur la

reconnaissance de l'épitope β -gal(450-462) (HPSVIWSLGNES), dérivé de la β -galactosidase, par l'hybridome de cellule T 1-F2 lorsque présenté dans un contexte I-E^P (Daniel, Horvath, et Allen 1998). Ces travaux ont permis d'identifier les positions P1(I), P6(G) ainsi que P9(S) comme les résidus permettant l'ancrage de l'épitope dans la niche peptidique I-E^P (Daniel, Horvath, et Allen 1998). À l'aide de l'identification de ces points d'ancrage ainsi qu'une banque combinatoire de peptides, un épitope synthétique mimant l'épitope naturel impliqué dans l'alloréactivité du clone T 2.102 contre I-E^P fut synthétisé et appelé EPM (**Figure 7**) (Daniel, Horvath, et Allen 1998). Certains résidus de l'épitope Hb(64-76) furent alors conservés dans la banque de peptides testés. Les quatre premiers résidus composant la séquence GKKV furent utilisés ici dans la portion N-terminale afin d'augmenter la solubilité des peptides testés (Daniel, Horvath, et Allen 1998). La différence majeure entre les peptides EPM et Hb(64-76) se situe principalement au niveau des positions centrales P3 et P5 qui ont été remplacées par les résidues aromatiques F et W (Daniel, Horvath, et Allen 1998). Ces résidus étant des points de contact avec le TCR 2.102 et leurs substitutions n'affectant pas la liaison au CMH I-E^P, cette différence prend toute son importance. La reconnaissance de Hb(64-76) ne tolérant aucune substitution du résidu P5 alors que l'alloreconnaissance étant très permissive aux substitutions de ce résidu, nous suggère un mécanisme de reconnaissance bien distinct entre ces deux ligands (Daniel, Horvath, et Allen 1998).

Le peptide EPM étant synthétique et sa séquence ne correspondant à aucune protéine murine connue, l'allopeptide naturel reste encore à identifier (Daniel, Horvath, et Allen 1998). Une tentative d'isolement et d'identification du peptide naturel fut publiée en 2006 par Felix et collaborateurs (Felix et al. 2006). Afin de faciliter l'isolement de ce peptide, une lignée cellulaire B6P.C3, exprimant un haut niveau de I-E^P ainsi qu'activant fortement le clone T 2.102 fut générée (Felix et al. 2006). Les complexes I-E^P furent par la suite purifiés et les peptides furent séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) puis analysés et séquencés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (Felix et al. 2006). Ainsi, un total de 295 peptides différents et répartis en 120 familles furent identifiés : chaque famille comportant une même séquence de 9 acides aminés centrale et les membres ne variant que par leurs extrémités C et N –terminales. Cependant, bien que 15% (19/120) des familles de peptides identifiées furent synthétisées et testées à l'aide de cellules CHO-E^P quant à leur habilité à stimuler le clone 2.102, aucune ne permit la

restauration de l'alloréactivité du clone (Felix et al. 2006), démontrant encore une fois le caractère peptide-spécifique de cette réaction alloréactive (Felix et al. 2006).

Ainsi donc, après avoir confirmé le motif de liaison peptidique au CMH I-E^P, les auteurs se sont tournés vers la bioinformatique afin de rechercher des candidats potentiels au travers de la banque de données protéiques du Centre National pour l'Information en Biotechnologie (NCBI) (Felix et al. 2006). Afin d'effectuer cette recherche, les auteurs ont basé leurs critères sur la séquence du peptide synthétique EPM ainsi que sur le motif de liaison peptidique obtenu précédemment (Felix et al. 2006). Ainsi des permutations aux positions P1 (Val, Ile, Leu), P5 (Trp, Asn) et P9 (Ser, Gln) ont été permises. Les positions P1 et P9 étant les points d'ancrages importants alors qu'à la position P5 les résidus permettant le contact avec le TCR ont été choisis (Felix et al. 2006). À l'aide de ces critères, les auteurs obtinrent deux candidats potentiels qui furent synthétisés : GPR128(531-545) et ARN PAF53(38-52) (Felix et al. 2006). Bien que ces deux candidats possèdent des similitudes avec la séquence EPM, seul GPR128(531-545) a démontré sa capacité à activer le clone de cellule T 2.102 (Felix et al. 2006) (**Figure 7**). De plus, des tests d'activation réalisés avec l'épitope GPR128 synthétisé, permirent d'observer que bien que les positions P10 et P11 ne soient pas cruciales pour la reconnaissance du complexe Hb(64-76)/I-E^k, elles sont clairement impliquées dans l'allorecognition du complexe GPR128(531-545)/I-E^P et peuvent dénoter un déplacement de l'orientation du TCR lors de son interaction avec le complexe pCMH ou une altération de la conformation pCMH (Felix et al. 2006).

Hb (64-76)	GKKVITAFNEGLK
EPM	GKKVITFSWGSLS
GPR128 (531-545)	YFLLVTFTWNGLSAT

Figure 7: Peptides identifiés reconnus par le TCR 2.102.

Toutefois, l'analyse de la séquence de GPR128 permet d'observer sa nature très hydrophobe, empêchant ainsi sa purification par HPLC (Felix et al. 2006). Ainsi, il a donc été impossible, pour les auteurs, d'isoler par HPLC le peptide GPR128 à partir des complexes I-E^P purifiés (Felix et al. 2006). Ainsi bien que l'épitope putatif GPR128(531-545) ait démontré sa capacité à induire la reconnaissance du complexe

alloréactif I-E^P par le TCR 2.102, il a été impossible de confirmer la présence de ce peptide dans les complexes pCMH II I-E^P exprimés à la surface de cellules allogéniques. Il reste donc à confirmer que GPR128 peut être naturellement apprêté et présenté adéquatement de façon à pouvoir stimuler le clone de cellule T 2.102. Son isolation étant donc problématique, une forte expression de GPR128 dans des cellules exprimant le CMH II I-E^P mais ne stimulant pas l'alloréactivité du TCR 2.102 tel que les fibroblastes CHO-E^P, pourrait permettre d'observer son impact sur la reconnaissance allogénique du CMH II I-E^P par le TCR 2.102. L'identification de l'allopeptide naturel impliqué dans la reconnaissance du CMH allogénique I-E^P par le TCR 2.102 permettrait éventuellement de résoudre la structure de cristallographie de l'interaction TCR 2.102/GPR128(531-545)/I-E^P. Ce patron de cristallisation pourrait ainsi nous permettre d'en apprendre un peu plus sur les bases moléculaires de l'allorecognition et de l'implication de la polyspécificité du TCR dans la haute fréquence de précurseur allogénique observé dans les épisodes de rejets d'organes *in vivo*.

VI. GPR128

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) représentent une super-famille de protéines transmembranaires très diversifiées et contenant plus de 800 membres chez l'humain (Fredriksson et al. 2003). Ils sont impliqués dans une vaste gamme de rôles physiologiques et comptent pour approximativement 50% des cibles des nouvelles molécules thérapeutiques (Klabunde et Hessler 2002; Bjarnadottir, Fredriksson, et Schioth 2007). Les GPCRs sont classifiés en cinq catégories connues sous l'acronyme GRAFS; 'Glutamate', 'Rhodopsin', 'Adhesion', 'Frizzled/Taste 2', 'Secretin' (Fredriksson et al. 2003).

Le récepteur GPR128 fait quant à lui partie de la famille des GPCRs d'adhésion. Cette famille est caractérisée par une longue extrémité N-terminale possédant de nombreux domaines, une structure génomique complexe comportant de nombreux introns et des variations d'épissage ainsi qu'une région à sept passages transmembranaires (Bjarnadottir, Fredriksson, et Schioth 2007). Chacune de ces régions transmembranaires est constituée de 25 à 35 acides aminés et montre une hydrophobicité importante (Bjarnadottir et al. 2004). Toutefois, peu d'information est disponible quant au rôle de cette région à sept passages transmembranaires et il n'est

pas encore bien démontré si les membres de cette famille sont couplés de façon fonctionnelle aux protéines G (Bjarnadottir, Fredriksson, et Schioth 2007). Bien que le rôle physiologique de GPR128 soit inconnu, plusieurs membres de la famille des GPCRs d'adhésion interagissent avec le système immunitaire, possèdent un rôle dans l'adhésion des cellules neuronales, inhibent l'angiogenèse ou sont impliqués dans le développement embryonnaire (Bjarnadottir, Fredriksson, et Schioth 2007). De plus, bien que GPR128 ne contienne qu'un domaine comportant un site de clivage protéolytique (GPS) ainsi que de nombreux sites de glycosylations, la nature des différents domaines retrouvés dans l'ensemble de cette famille semble indiquer la présence d'interactions de type intégrine ou cadhérine avec d'autres cellules ou directement avec la matrice extracellulaire (Bjarnadottir, Fredriksson, et Schioth 2007).

Bien que peu de travaux aient été effectués sur GPR128, il a été observé que ce récepteur est exprimé dans plusieurs tissus tels que le colon, les testicules et la rate (Bjarnadottir et al. 2004; Felix et al. 2006). Toutefois, son expression dans différentes populations cellulaires tel que les CPA reste inconnue (Felix et al. 2006). Ainsi, dans la mesure où nous pouvons identifier GPR128(531-545) comme l'allopeptide impliqué dans l'alloreconnaissance du TCR 2.102 nous devons évaluer si la génération de l'épitope dans les CPA allogéniques s'effectue à l'aide d'un processus d'apprêtement tel que l'autophagie ou si elles s'approprient cet épitope en phagocytant ce dernier dans leur environnement tissulaire.

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

I. Clonage du gène GPR128

A. Souris

Pour les fins du clonage du gène GPR128, les rates de souris B6.AKR et B6.12952-Tcra^{tm1Mom} furent prélevées. La lignée de souris B6.AKR nous a été gracieusement offerte par le Dr Paul M.Allen (Washington University, St-Louis, MO), alors que les souris B6.12952-Tcra^{tm1Mom} ont été obtenues du fournisseur The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Les souris utilisées ont été hébergées au Centre de Biologie Expérimentale de l'INRS - Institut Armand-Frappier.

1. Extraction d'ARN total

Les extractions d'ARN total qui ont été réalisées dans le but de cloner GPR128 ont été effectuées à l'aide de la trousse d'extraction d'ARN 'RNeasy Mini Kit' (QIAGENTM, Mississauga, Canada).

Protocole QIAGENTM

Lors de l'utilisation de la trousse 'RNeasy Mini Kit' (QIAGENTM, Mississauga, Canada), les rates prélevées furent coupées en deux puis conservées dans 1 ml de RNAlater (QIAGENTM, Mississauga, Canada) jusqu'au moment de l'extraction. Lors de l'extraction, l'échantillon fut homogénéisé à l'aide d'un pilon pour eppendorf dans 500 µl de Trizol[®] Reagent (InvitrogenTM, Burlington, Canada). Par la suite, 500 µl de Trizol[®] Reagent furent ajoutés puis le tout fut incubé cinq minutes à température ambiante. Deux cents microlitres de chloroforme furent ensuite ajoutés, puis incubés 2 minutes à température ambiante après avoir agité le tout vigoureusement. Le reste de l'extraction s'est effectué selon le protocole décrit dans la trousse RNeasy Mini Kit (QIAGENTM, Mississauga, Canada).

2. Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)

La synthèse d'ADNc fut réalisée à l'aide de la transcriptase inverse SuperScriptTM III (InvitrogenTM, Burlington, Canada) et selon le protocole suggéré par le manufacturier.

B. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) nous ont été utiles afin d'amplifier le gène GPR128 pour des fins de clonage. De plus, plusieurs clones ont été criblés à l'aide de cette technique.

Lorsque cette technique fut utilisée pour des fins de clonage, la polymérase utilisée fut la Phusion™ Hot Start (Finnzymes, Espoo, Finlande). Chaque réaction de PCR contenait du tampon Phusion™ HF 1X, 200 µM de dNTPs 0,5 µM de chaque amorce, 100 ng d'ADNc et 0,02 U/µl de polymérase Phusion™ Hot Start.

Il est à noter que lorsque des réactions PCR furent effectuées directement à partir de vecteur, le produit de PCR a subi une double digestion à l'aide de l'enzyme Dpn I afin d'éliminer l'ADN matrice

Quant aux PCR utilisées pour des fins autres que le clonage, tels que la validation des amorces ou le criblage des clones, la polymérase *Taq* fut utilisée. Chaque réaction de PCR contenait le tampon PCR (200mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,4), 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de chaque amorce, de 100 ng d'ADN et 0,05 U/µl de polymérase *Taq*.

Les amorces utilisées pour les réactions de PCR ont été produites par le service de synthèse d'oligonucléotides de la compagnie Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA).

La réaction de PCR fut réalisée à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler Gradient (Eppendorf Canada, Mississauga, Canada). Bien que les conditions utilisées furent variables en fonction des amorces utilisées et de la longueur du segment à amplifier, les cycles de dénaturation furent effectués à 98°C lors de l'utilisation de la polymérase Phusion™ Hot Start et 95°C lors de l'utilisation de la polymérase *Taq*. Dans tous les cas, la température d'élongation fut fixée à 72°C et les nombres de cycles ont oscillé entre 35 et 40.

Tableau 3: Séquences des amorces utilisées.

#	Nom	Sens	Séquence 5' --> 3'
1	li + 2	+	GGTACCGGTACCATGGATGACCAACGCGACCT
2	li Exon 4 -	-	GGTAACGTTCTTCACAGGCC
3	GPR128 5'	+	GGATCCGGATCCAGTGTGTTGGCTTCACCATG
4	GPR128 3'	-	GCGGCCGCGCGGCCGCTTCAAGACAATGATGTTTCC
5	GPR128 3' Franc	-	TCAAGACAATGATGTTTCTCAGT
6	GPR128 3' + 2xKpn I	-	GGTACCGGTACCTCAAGACAATGATGTTTCTCAGT
7	GPR128 Exon 7	+	TCTTATCAAGCAAATGGAGAATTA
8	GPR128 Exon 8	-	TTTCCCCAGTATTAAGTAAGATCT
9	GPR128 Exon 8 + 2xHind III	-	AAGCTTAAGCTTTTTTCCCCAGTATTAAGTAAGATCT
10	GPR128 Exon 13	+	CGATTGGGAGTATTTATGCC
11	GPR128 Exon 14	-	CTTGTCAGGTTCTGGTTGTT
12	GPR128 Exon 14 + 2xSal I	-	GTCGACGTCGACCTTGTCAGGTTCTGGTTGTT
13	GAPDH 5'	+	CATGTTCCAGTATGACTCCACTC
14	GAPDH 3'	-	GGCTCACCCCATTTGATGT
15	pSK - GPR128 5'	+	TGATCAGACAGTGGTGGAAACCCAA
16	pSK - GPR128 3'	-	TCCAGGTGAATGTCACCAGCAGAA
17	GPR128 526-559 5'	+	GGATCCGGATCCGCTGCCTTGCTCCACTACTTTC
18	GPR128 526-559 3'	-	GGATCCGGATCCGAGGGAGAGGCTTCATGGTTC
19	GPR128 Xho I 5'	+	CCGTCACTCGAGACGACAATTTCAG
20	GPR128 SnaB I 3'	-	CTTTTGTACATAGTAGGATTAAATAC
21	li-GPR128 5'	+	CCACTGGACATGGAAGACCT
22	li-GPR128 3'	-	CAGGTGAATGTCACCAGCAG
23	li-GPR128 531-545 5'	+	TGGAATGGACTCAGTGCTACAGGATCCTGAATGAATGAT CTAGAGC
24	li-GPR128 531-545 Analogue 3' (2)	-	GGTGAATGTCACCAGTTTCTTACCTGGATCCTTCTCTGA CTTCTTCTCTCG
25	li-GPR128 531-545 3' (2)	-	GGTGAATGTCACCAGCAGAAAGTATGGATCCTTCTCTGA CTTCTTCTCTCG
26	GPR128 Génomique + 2xSac I	+	GAGCTCGAGCTCGTAAAAGCTCAGCCAGTG
27	GPR128 Génomique + 2xBamH I	-	GGATCCGGATCCCATGGAATAAATTACCGTAGG
28	Délétion GPR128 526-530 5'	+	TACTTTCTGCTGGTGACATTC
29	Délétion GPR128 526-530 3'	-	GGATCCTCCTGACTTCTTCTC
30	Délétion GPR128 546-559 5' (2)	+	CGGATCCTGAATGAATGATCT
31	Délétion GPR128 546-559 3'	-	TGTAGCACTGAGTCCATTCCA

*La concentration de tous les stocks d'amorces a été fixée à 200µM et entreposés à -20°C.

C. Manipulation d'ADN

1. Phosphorylation des amorces

Les amorces utilisées lors des réactions de PCR, dont le produit devant être directement ligué sans digestion préalable, ont dû être phosphorylées de façon à permettre la ligation. Cette phosphorylation a été effectuée dans un volume total de 50 µl et contenant 50 µM d'amorce, le tampon T4 Kinase (70 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol) et 10 U de T4 polynucléotide Kinase. Le volume de la réaction fut complété à 50 µl à l'aide d'eau distillée stérilisée puis le mélange fut incubé 30 minutes à 37°C. L'enzyme fut ensuite inactivée à l'aide d'une incubation de 20 minutes à 65°C.

2. Digestions

Plusieurs enzymes de restrictions furent utilisées pour générer des extrémités franches ou cohésives afin de réaliser nos constructions d'ADN. Les digestions furent effectuées dans un volume variant entre 20 μ l et 50 μ l en fonction du volume d'enzyme à utiliser, ce dernier ne pouvant pas dépasser 10% du volume total. La quantité d'enzyme utilisée fut de l'ordre d'une unité¹ par μ g d'ADN utilisé. Les réactions furent effectuées dans le tampon NEB suggéré par le fabricant. De plus, en fonction de l'enzyme de restriction utilisée, la réaction contenait 100 μ g/ml d'albumine de sérum bovin (BSA). Les digestions furent incubées une heure à la température recommandée par le fabricant. Dans les cas de figure où des digestions séquentielles furent effectuées dans des tampons différents, les enzymes furent inactivées à la température prescrite par le fabricant. Lorsque l'inactivation à la chaleur fut impossible, une purification au phénol/chloroforme ou sur gel d'agarose fut effectuée tel que présenté aux sections VI.C.5 et VI.C.7 de la présente partie.

3. Génération d'extrémités franches

Certaines stratégies de clonages utilisées nous ont contraint à générer des extrémités franches à partir d'extrémités cohésives. La polymérase d'ADN T4 distribuée par NEB fut alors utilisée. Celle-ci permet d'enlever les saillies 3' et de remplir les saillies 5' afin de générer des extrémités franches. Les réactions furent effectuées dans un volume total de 100 μ l comportant le tampon NEB4 (50 mM acétate de potassium, 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 1 mM dithiothreitol, pH7,9), 100 μ M de dNTPs et 1 U d'enzyme par μ g d'ADN. La réaction fut ensuite incubée 15 minutes à 12°C. L'enzyme fut par la suite inactivée en ajoutant de l'EDTA à raison de 10 mM puis incubé 20 minutes à 75°C. L'ADN fut par la suite purifié par un traitement au phénol/chloroforme afin de préparer l'ADN à une nouvelle digestion.

4. Déphosphorylation

Afin d'empêcher la recircularisation des vecteurs ouverts lors des ligations, les extrémités 5' de ces derniers furent déphosphorylées. Pour y parvenir, la phosphatase alcaline intestinale de veau (CIP) fut utilisée selon le protocole reconnu par le manufacturier. Préalablement à la déphosphorylation des vecteurs, les enzymes de

¹ 1 unité correspond à la quantité nécessaire pour digérer 1 μ g d'ADN en une heure.

restrictions utilisées furent inactivées à la chaleur ou éliminées par une purification phénol/chloroforme. Par la suite, la réaction fut purifiée sur gel d'agarose.

5. Purification par phénol/chloroforme

La purification phénol/chloroforme fut utilisée, lors de l'élaboration des constructions, afin d'éliminer différentes enzymes ne pouvant pas être inactivées à l'aide d'un traitement thermique. L'ADN fut alors purifié en ajoutant du phénol/chloroforme à raison d'un ratio volume /volume de 1 :1. Après avoir agité le mélange au vortex, ce dernier fut centrifugé 5 minutes à 21 000 G. Le surnageant obtenu fut récolté puis l'ADN fut récupéré à l'aide d'une précipitation à l'éthanol.

6. Précipitation à l'éthanol

La précipitation à l'éthanol a été utilisée afin de récupérer l'ADN présent dans différentes solutions. Pour y arriver, de l'éthanol 100% conservé à -20°C a été ajouté à un ratio de 2,5 fois le volume à précipiter. Puis de l'acétate de sodium ainsi que du glycogène furent ajoutés de façon à obtenir une concentration respective finale de 0,3 M et 0,8 mg/ml. Après avoir agité le tout au vortex, le mélange fut incubé pour un minimum de 30 minutes à -20°C. L'échantillon fut par la suite centrifugé 15 minutes à 21 000 G. Après avoir jeté le surnageant, le culot fut lavé à l'aide de 100 µl d'éthanol 70% conservé à -20°C puis centrifugé 15 minutes à 21 000 G. Le culot fut par la suite séché 2 minutes à 55°C sur un bain sec ou 5-10 minutes au Centrivap (Labconco, Kansas City, Missouri, USA). L'ADN fut par la suite resuspendu dans le volume adéquat de 10 mM Tris-HCl pH 8 contenant 20 µg/ml de RNase.

7. Purification d'ADN sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN qui ont été manipulés furent purifiés sur gel avant de les lier ensemble. L'ADN à purifier fut suspendu dans un volume inférieur à 50 µl puis chargé sur un gel d'agarose. Du bleu de bromophénol (37,8% Glycérol, 0,25% Bleu de Bromophénol) ou du xylène cyanol FF (40% Glycérol, 0,25% Xylène Cyanol FF) fut ajouté à l'ADN à purifier selon un ratio de 1:6 (Tampon : ADN). Le bleu de bromophénol, fut utilisé lors de la migration de fragments supérieurs à 400 pb alors que le xylène cyanol FF fut utilisé dans les cas où les fragments furent inférieurs à 400 pb. La concentration du gel utilisé fut choisie en fonction de la longueur des fragments d'ADN à purifier. Les fragments dont la taille était inférieure à 500 pb ont été purifiés sur des gels d'agarose à 2%, alors que ceux dont la taille était supérieure à 500 pb l'ont été sur des

gels d'agarose à 1%. Toutefois, dans certains cas, des gels à 0,5% et à 2,5% furent utilisés. Les gels d'agarose ont été préparés à l'aide des tampons TAE (0,04M Tris-Acétate, 0,001M EDTA pH 8,3) ou TBE (0,045M Tris-Borate, 0,001M EDTA) et contenaient 1 µg/ml de bromure d'éthidium.

Différents produits ont été chargés parallèlement afin de servir d'échelle de poids moléculaires, nous permettant d'évaluer la longueur des bandes observées. Dans le cas de petits fragments, 0,5 µg de l'échelle moléculaire 100 pb (NEB) fut chargé. Alors que lors de l'évaluation de la longueur de plus gros fragments, 1 µg de l'échelle moléculaire 1 Kb + (NEB) fut chargé.

La migration fut effectuée sous un courant de 100 volts et sur une période variant entre 30 et 60 minutes. Le gel d'électrophorèse fut par la suite photographié à l'aide de l'appareil AlphaImager™ 3400 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Les bandes d'intérêts furent par la suite découpées pour en extraire l'ADN. Deux trousseaux d'extractions furent utilisés lors ces travaux : GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences) et QIAEX II (QIAGEN, Mississauga, On, Canada). Les trousseaux furent utilisés selon le protocole du manufacturier.

8. Dosage des acides nucléiques

La concentration des acides nucléiques fut évaluée à l'aide de deux techniques. Le dosage sur gel par densitométrie fut employé en prévision des ligations. Cette technique permet de doser les vecteurs et les inserts afin de respecter les différents ratios utilisés pour effectuer les diverses ligations. Quant à la méthode par spectrophotométrie, cette dernière fut utilisée afin d'évaluer la concentration d'ARN issu des extractions, de l'ADNc issu des réactions de transcriptase inverse et de l'ADN plasmidique.

a) Densitométrie sur gel

Le dosage sur gel s'est effectué en déposant sur un gel d'agarose (0,5% à 2 %) 1 µl de l'ADN à doser. Pour effectuer le dosage, 3 µg du bactériophage λ digéré avec l'enzyme de restriction PstI furent chargés parallèlement afin de servir d'échelle moléculaire. Puis, suite à la migration, l'intensité des bandes de l'échelle moléculaire fut comparée à la bande à doser à l'aide du logiciel AlphaEase (Alpha Innotech) et la quantité d'ADN fut extrapolée à la suite de ce comparatif.

b) Spectrophotométrie

Le dosage d'ARN ou d'ADN par spectrophotométrie s'est effectué à l'aide du spectrophotomètre GeneQuant RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotech). Les échantillons furent dilués dans de l'eau distillée puis leur densité optique (DO) fut mesurée à 260 nm et 280 nm. Le ratio DO_{260}/DO_{280} devait être compris entre 1,7 et 2,0 pour les dosages d'ADN alors qu'il devait se situer entre 1,9 et 2,0 pour le dosage de l'ARN.

9. Ligations

Après que les différents fragments d'ADN furent purifiés et dosés, leur ligation s'est effectuée suivant les paramètres suivants. Lorsqu'un insert fut ligué à un vecteur ouvert possédant deux extrémités cohésives, cette dernière eut lieu selon un rapport molaire de 3:1 (insert : vecteur) et à une concentration totale variant entre 10 et 30 ng/ μ l. Les ligations comportant au moins une extrémité franche ont eut lieu selon un rapport molaire variant entre 5:1 et 10:1 (insert : vecteur), en fonction du nombre d'extrémités franches impliquées. La concentration totale d'ADN utilisée dans la ligation d'extrémités franches fut située entre 40 et 100 ng/ μ l. Toutes les ligations furent effectuées dans un volume total de 10 μ l, comportant 1 μ l de tampon d'ADN ligase T4 10X (NEB) ainsi que 0,5 μ l d'ADN ligase T4 (NEB). La réaction fut incubée à température pièce pour une durée variant entre 4 et 18 heures.

10. Vecteur utilisé

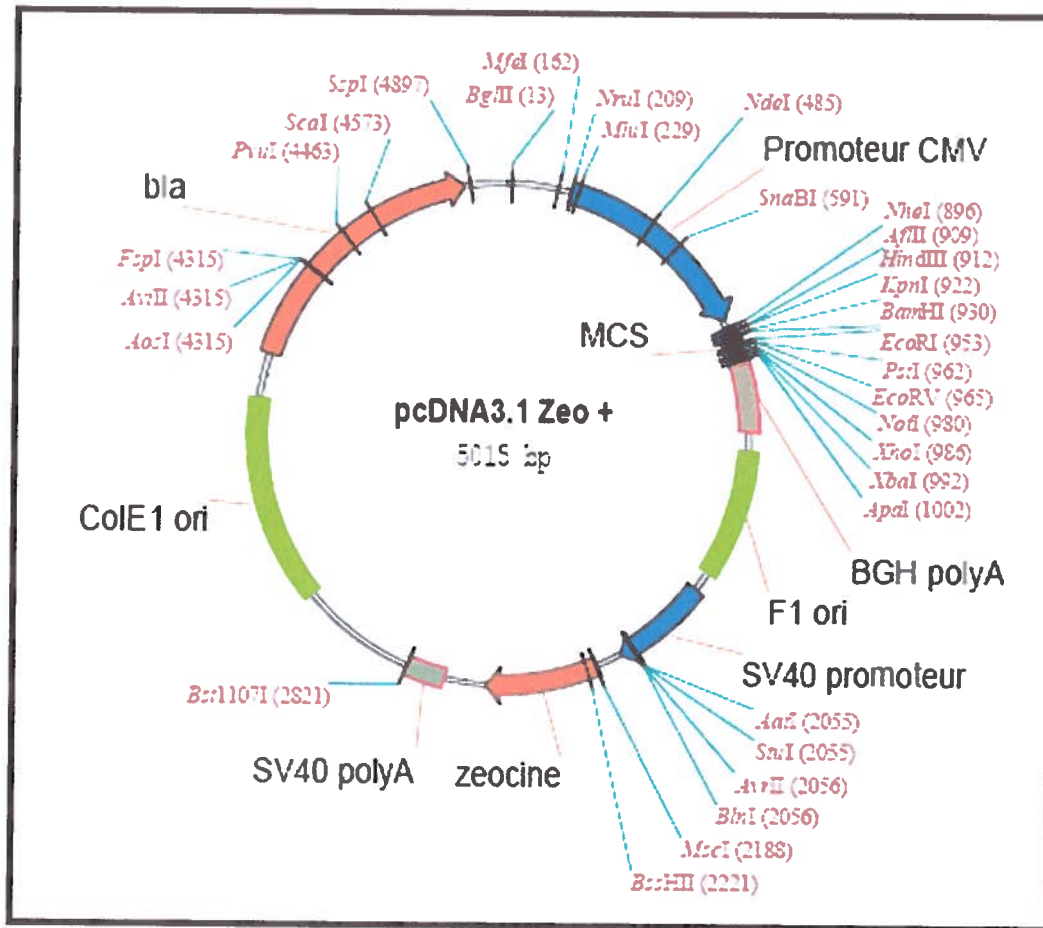


Figure 8 : Vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo (+).

Distribué par Invitrogen™ (#cat. V860-20), ce vecteur comporte une région de sites de clonages multiples (MCS) sous le contrôle d'une région promotrice du cytomégalo virus humaine (CMV). Les régions T7 et BGH-reverse sont situées de part et d'autre de la MCS et permettent son séquençage. Le gène Zeocin™, sous le contrôle du promoteur SV40, permet la sélection de cette construction dans des cellules eucaryotes. L'origine de réplication ColE1 permet l'obtention d'un grand nombre de copies de cette construction chez la bactérie *Escherichia coli*. Quant au gène de résistance à l'ampicilline, *bla*, ce dernier permet la sélection de la construction dans les bactéries. Les sites de restrictions uniques sont illustrés dans cette figure en rouge.

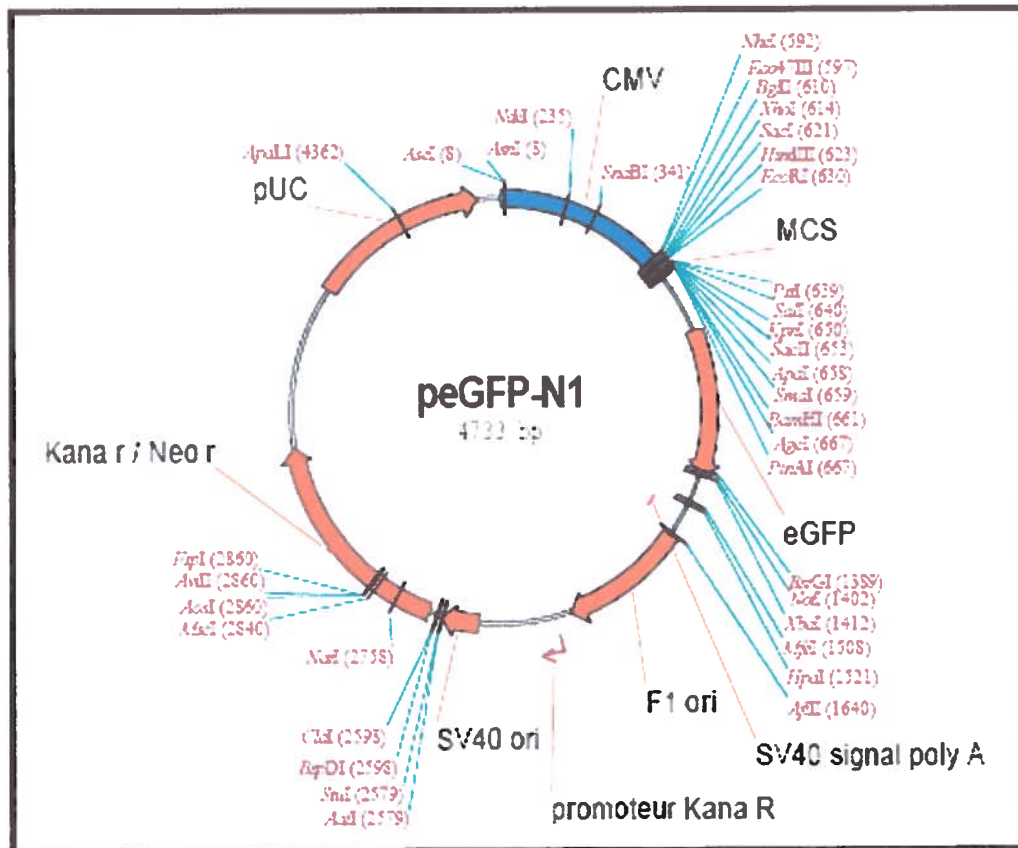


Figure 9 : Vecteur d'expression peGFP-N1.

Ce vecteur nous a été gracieusement offert par la firme Montréal Biotech Inc. Ce dernier encode pour une GFP, optimisée pour une meilleure fluorescence ainsi qu'une expression améliorée chez les cellules de mammifère. L'expression de cette GFP est sous le contrôle d'un promoteur CMV. Encode pour un gène de résistance à la kanamycine et à la néomycine afin de pouvoir effectuer la sélection de la construction. (Ref. U55762).

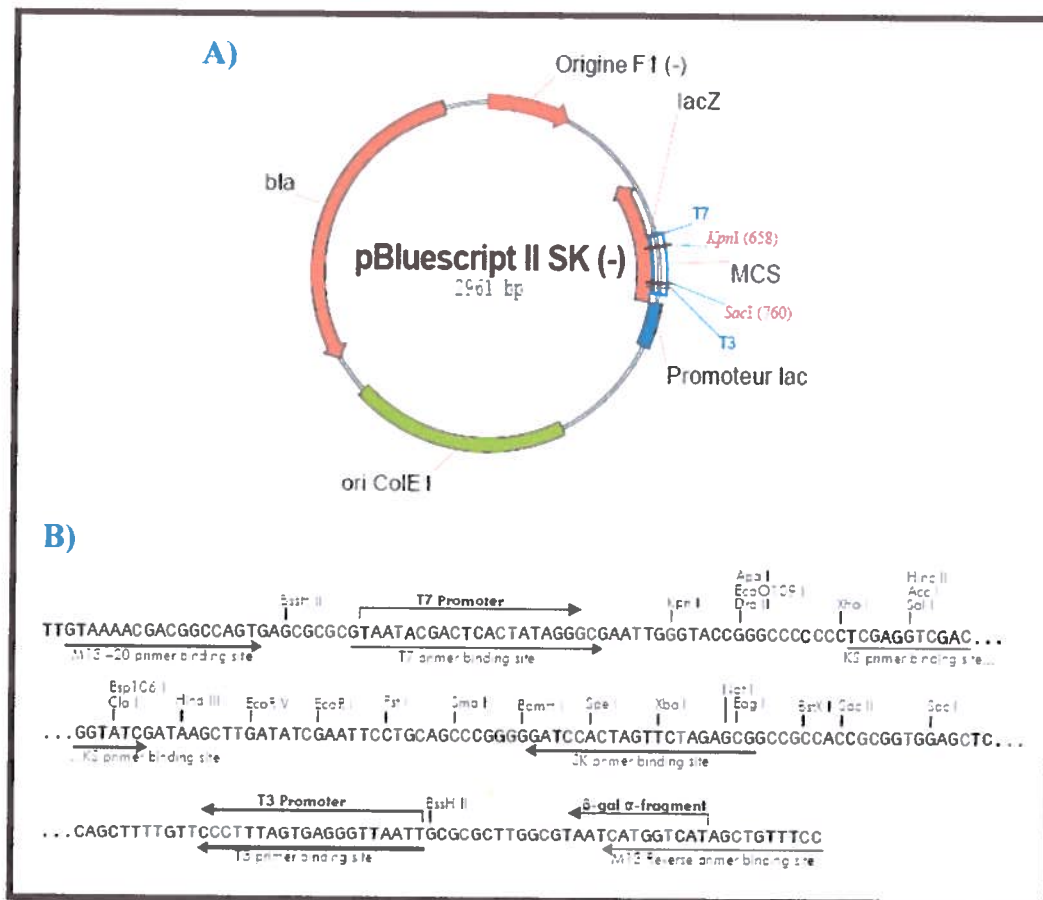


Figure 10 : Vecteur d'expression pBluescript II SK (-) Phagemid.

Vecteur distribué par Stratagene™ (cat. # #212206) d'une longueur de 2961 pb. Ce dernier possède une région de sites de clonage multiples (MCS) située à l'intérieur du gène *lacZ*, permettant ainsi un criblage rapide des colonies bactériennes. De plus, ce dernier encode pour le gène *bla*, permettant une résistance à l'ampicilline.

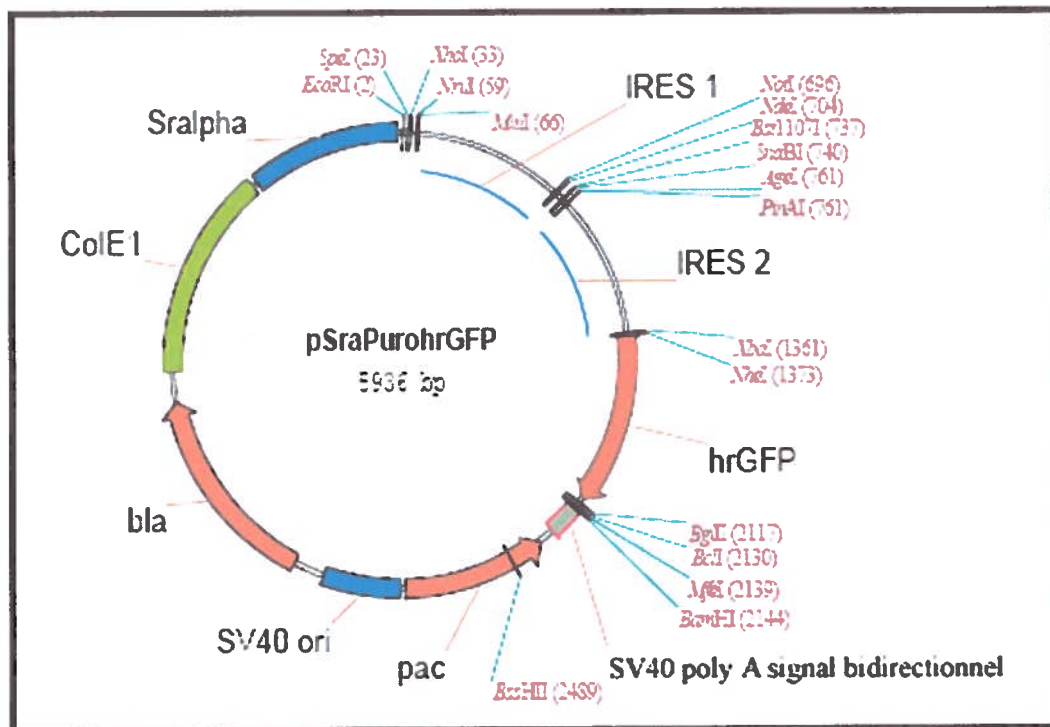


Figure 11 : Vecteur d'expression Srapuro2IREShrGFP.

Vecteur d'expression (référence : AY613996) tri-cistronique, d'une longueur de 5956 pb, permettant l'expression de 3 gènes sous le contrôle d'un seul promoteur Sra. Ce dernier encode le gène hrGFP et contient les gènes *bla* et *pac* qui confèrent respectivement la résistance à l'ampicilline et à la puromycine. Gracieuseté du Dr François Denis et de Véronique Allard (Allard 2005).

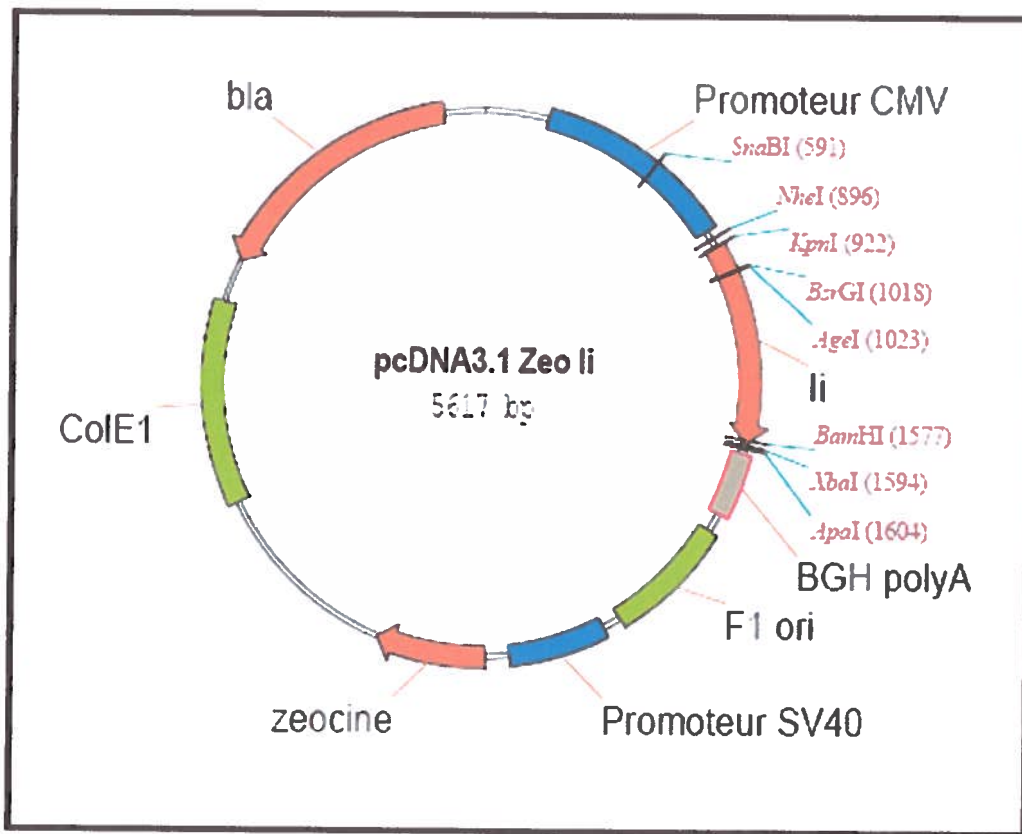


Figure 12 : Vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo li.

D. Transformation bactérienne

Différentes constructions d'ADN et produits de ligations ont dû être introduits dans diverses lignées de bactéries compétentes. Certaines enzymes de restrictions étant sensibles aux méthylations à la position N⁶ des adénines comprises dans les séquences GATC, par conséquent, leur substrat a dû être amplifié dans une lignée de bactéries compétentes déficientes en méthylase *dam*. Dans tous les autres cas, la souche de bactéries compétentes DH5 α fut utilisée. Les deux souches bactériennes utilisées furent transfectées à l'aide d'un choc thermique. Après la transfection, les bactéries furentensemencées sur des géloses LB contenant 1,5% de bacto-agar (Difco, BD, Oakville, On, Canada) ainsi qu'un antibiotique permettant la sélection des clones transfectés. La sélection fut effectuée avec 100 μ g/ml d'ampicilline ou de 30 μ g/ml de kanamycine en fonction de la construction transfectée.

1. Subcloning Efficiency DH5α

Au moment de la transfection, les bactéries furent décongelées sur glace puis 5 µl d'ADN furent ajoutés. Les bactéries furent par la suite incubées 3 minutes sur glace, puis 20 secondes à 42°C et enfin 2 minutes sur glace. Après leur avoir ajouté 950 µl de milieu LB, les bactéries furent par la suite incubées une heure à 37°C et sous agitation à 225 rpm. Les tubes furent par la suite centrifugés 2 minutes à 10 000 G puis le culot fut resuspendu dans 200 µl de milieu LB. Enfin, 100 µl de bactérie fut alors étalé sur les géloses, puis incubé 18 heures à 37°C.

2. dam-/dcm- competent E.coli

Après l'ajout de 5 µl d'ADN, les bactéries furent incubées 30 minutes sur glace, puis 20 secondes à 42°C et enfin 5 minutes sur glace. Deux cent cinquante microlitres de milieu SOC (2% vegetable peptone, 0,5% Yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl,) leur fut ajouté puis incubés 1 heure à 37°C. Enfin, 100 µl de bactéries fut alors étalé sur les géloses, puis incubé 18 heures à 37°C.

Tableau 4: Génotypes des souches bactériennes utilisées

#	Souche Bactérienne <i>Escherichia. coli</i>	Génotype	Source
1	Subcloning Efficiency DH5α	F- Φ80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r _K , m _K ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻ ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet ^S endA1 rspL136 (Str ^R) dam13::Tn9 (Cam ^R) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2	Invitrogen™
2	dam-/dcm- competent E.coli		NEB

E. Criblage des clones recombinants

Les colonies obtenues furent criblées afin de déterminer celles possédant la construction désirée. Un minimum de 5 colonies furent analysées lors de chaque clonage. Chacune des colonies isolées fut inoculée de façon stérile dans 5 ml de milieu LB (1% bactotryptone, 0,5% bacto-yeast extract, 0,18 M NaCl, pH7,0) contenant 100 µg/ml d'ampicilline puis incubée 18 heures à 37°C sous agitation à 225 rpm. Par la suite, 3 ml de ce bouillon de culture fut centrifugé 30 secondes à 12 000G puis le surnageant fut enlevé par aspiration.

1. Miniprep par lyse alcaline

L'ADN plasmidique du culot bactérien fut par la suite extrait à l'aide d'une lyse alcaline. La procédure suivie fut celle publiée par Maniatis (Sambrook, Fritsch, et

Maniatis 1989). L'ADN fut ensuite dissous dans le volume adéquat de Tris-HCl 10 mM pH 8 contenant 20 µg/ml de RNase.

2. Digestions et migration sur gel

L'ADN plasmidique, ainsi extrait des différentes colonies isolées sur gélose LB, fut par la suite digéré à l'aide de diverses enzymes de restriction, ceci, de façon à pouvoir générer un patron de fragments d'ADN dont les longueurs furent propres à la construction recherché. Le protocole de digestion utilisé fut le même que celui présenté à la section VI.C.2 de la présente section. Par la suite, le produit de digestion fut chargé sur gel d'agarose 1%, contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium tel que présenté à la section VI.C.7 de la présente section.

F. Séquençage

Suite à la confirmation par digestion ou par réaction PCR des clones obtenus, ces derniers furent envoyés au service de séquençage du Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill.

1. Préparation de l'ADN

Afin d'obtenir un degré de pureté adéquat pour le séquençage, l'extrait d'ADN des différentes constructions à séquencer fut effectué à l'aide de la trousse QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN™, Mississauga, On, Canada). Par la suite, 10 µl d'ADN à 100-500 µg/µl fut envoyé. Quant aux amorces nécessaires à la réaction de séquençage, 5 µl à 20 µM leur fut envoyé lorsque demandées (**Tableau 3**). Les amorces présentées dans le tableau ci-dessous furent fournies directement par le service de séquençage (**Tableau 5**).

Tableau 5: Séquences des amorces fournies par le service de séquençage.

#	Amorces	Séquence
1	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
2	T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
3	BGH reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG

2. Alignement

Les séquences obtenues furent analysées à l'aide du logiciel Chromas (Technelysium Ltd, Tewantin, Australie). Par la suite, les séquences furent comparées aux séquences théoriques générées à l'aide du logiciel Vector NTI®. Quant aux alignements entre les séquences, ils furent effectués à l'aide du service BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible sur le site du Centre National d'Information sur les Biotechnologies (NCBI). La séquence NM_172825, correspondant à l'ARNm de GPR128 chez *Mus musculus*, fut utilisée afin d'effectuer les alignements des diverses constructions. Quant aux positions des introns et des exons dans la séquence génomique de GPR128, elles furent identifiées à l'aide de la séquence MGI:2441732 disponible sur le site de Mouse Genome Informatics ainsi que la séquence ENSMUT00000023437 disponible sur le site Ensembl Genome Browser.

G. Préparation d'ADN à grande échelle

Une fois la séquence confirmée, 1 ml de bouillon de culture du clone identifié fut utilisé afin d'inoculer 500 ml de milieu LB contenant l'antibiotique adéquat (section D). Suite à une incubation de 18 heures à 37°C et sous agitation, le bouillon de culture fut centrifugé, à une température de 4°C, 15 minutes à 6 000 G. Par la suite, l'ADN fut extrait du culot bactérien à l'aide du kit Maxiprep® ou Maxiprep Endofree®, tous deux distribués par QIAGEN™ et selon le protocole du manufacturier.

II. Évaluation du potentiel alloréactif de l'épitope GPR128(531-545) dans le modèle du TCR 2.102

A. Lignées cellulaires

Afin d'évaluer l'implication de GPR128 dans l'allorecognition du TCR2.102 contre le CMH de classe II I-E^P, plusieurs lignées cellulaires furent nécessaires. La lignée de fibroblastes CHO-E^P (Daniel, Horvath, et Allen 1998) ainsi que le lymphome de cellules B CH27-E^P (Daniel, Grakoui, et Allen 1998) furent utilisés comme CPA. Quant à l'hybridome 2.102, résultant de la fusion du clone Th₂ 2.102 et du lymphome T $\alpha\beta$ BW5147 (Evavold, Sloan-Lancaster, et Allen 1994), il fut utilisé dans les tests d'activation. Le clone de cellules T CTLL-2, dérivé de la lignée de souris C57BL/6 et dépendant de la présence d'IL-2, fut utilisé afin d'effectuer les dosages d'IL-2 sécrété lors des tests d'activation de l'hybridome 2.102.

La ligné CHO-E^P fut maintenue en culture dans du milieu MEMα (Invitrogen™, Burlington, Canada) contenant; 5% (v/v) de SVF (Invitrogen™, Burlington, Canada) décomplémenté. Ces cellules furent décollées à l'aide de versène lors des passages cellulaires. Quant à l'hybridome T 2.102 et au lymphome CH27-E^P, ils furent maintenus en culture à l'aide de milieu RPMI-1640 (Invitrogen™, Burlington, Canada) contenant 10% de SBV (Invitrogen™, Burlington, Canada) décomplémenté ainsi que 1% de 2-mercaptoéthanol 3,7 M (Sigma-Aldrich, Oackville, Canada). Les CTLL-2, quant à elles, furent maintenues en culture à l'aide de milieu RPMI-1640 (Invitrogen™, Burlington, Canada) contenant 10% de SBV (Invitrogen™, Burlington, Canada) décomplémenté ainsi que 0,2 ng/ml d'IL-2 (R&D system, Minneapolis, USA). À la totalité des milieux de cultures, furent ajoutés 1% de glutamax (Invitrogen™, Burlington, Canada) et 1% de gentamicine (Invitrogen™, Burlington, Canada). Les cellules furent incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂.

B. Transfections transitoires

1. Lipofectamine™ 2000

Le fibroblaste CHO-E^P fut transfecté à l'aide de lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Burlington, Canada) selon un protocole publié par Invitrogen pour les CHO-K1. Vingt-quatre heures précédant la transfection, 6.0×10^5 cellules par puits furent déposées dans une plaque 6 puits à fond plat. Les cellules furent déposées dans 2,5 ml/puits de milieu MEMα contenant 5% (v/v) de SVF (Invitrogen™, Burlington, Canada) décomplémenté, 1% glutamax (Invitrogen™, Burlington, Canada) et sans gentamicine. La quantité de cellules et le volume de milieu furent ajustés afin de répondre à différents formats de plaques lors de diverses expériences. Le ratio de Lipofectamine™ 2000 utilisé fut optimisé à 1: 3,125 (ADN : Lipofectamine™ 2000) et la quantité d'ADN utilisée par réaction fut de 4 µg. La période d'incubation pour la formation des complexes ADN : Lipofectamine™ 2000 fut optimisée à 20 minutes à température ambiante. Après l'ajout des complexes sur les cellules, les plaques furent incubées 5 heures à 37°C et 5% CO₂. Puis le milieu fut changé et les plaques furent incubées 16-18h à 37°C et 5% CO₂.

2. Microporation

La microporation s'est effectuée sur les lignées CHO-E^p et CH27-E^p. Précédant la transfection, les cellules furent lavées à l'aide de DPBS (-Mg²⁺, -Ca²⁺) (Invitrogen, Burlington, Canada), puis resuspendues dans du tampon d'électroporation R (NanoEnTek Inc, Séoul, Corée) à raison de $5,0 \times 10^3$ cellules/ μ l dans le cas des CHO-E^p et $3,0 \times 10^4$ cellules/ μ l pour les CH27-E^p. Lors de la transfection des CHO-E^p, 0,05 μ g/ μ l d'ADN fut utilisé. Elles furent microporées à l'aide de 10 impulsions d'une durée de 5 ms et de 1560 Volts. Quant aux CH27-E^p, elles furent microporées à l'aide de deux conditions distinctes. En premier lieu elles furent transfectées à l'aide de 0,05 μ g/ μ l d'ADN ainsi que de 2 impulsions d'une durée de 10 ms et de 1300 volts. Puis en second lieu, elles furent transfectées à l'aide de 0,15 μ g/ μ l d'ADN ainsi que d'une impulsion de 20 ms et de 1725 volts. Après la microporation, les cellules furent déposées dans les puits d'une plaque 24 puits contenant 500 μ l de milieu sans gentamincine par puits. La mortalité ainsi que le pourcentage de cellules transfectées furent évalués 24 heures post-transfection par cytométrie en flux.

C. Analyse de cytométrie en flux

Le marquage à l'aide d'anticorps primaires et secondaires fut utilisé afin d'évaluer le degré de pureté des populations CD4⁺/CD8⁺, CD11c⁺ et CD11b⁺, isolées sur billes d'affinités. Les anticorps CD4-FITC (eBiosciences, San Diego, USA), CD8-FITC (eBiosciences, San Diego, USA), CD4-APC (eBiosciences, San Diego, USA), Streptavidine-PE (BD Biosciences, Mississauga, Canada) furent utilisés à une dilution 1/100 alors que l'anticorps CD11c-PE (eBiosciences, San Diego, USA) fut utilisé à une dilution 1/50. Quant à l'anticorps CD11b-Biotine (eBiosciences, San Diego, USA), il fut utilisé à une dilution 1/200. Les anticorps furent incubés en contact avec les cellules 25 minutes sur glace et en absence de lumière, puis lavés 2 fois à l'aide de 2 ml de tampon FACS.

La viabilité fut évaluée à l'aide de deux marqueurs distincts. L'utilisation de monoazide d'éthidium (EMA) fut privilégiée lorsque les cellules ($\leq 5 \times 10^5$) ont dû être fixées à l'aide de paraformaldéhyde 2% avant l'analyse des cellules en cytométrie en flux, alors que l'iodure de propidium (IP) fut utilisé sur des cellules ($\leq 1 \times 10^6$) qui ne furent pas fixées au paraformaldéhyde 2%. Les deux composés furent utilisés selon les protocoles des fabricants.

Le cytomètre en flux (BD FACScalibur, BD Bioscience, Mississauga, Canada) fut utilisé. Lors de l'acquisition des données de cytométrie en flux, le logiciel BD CellQuest™ (BD Bioscience, Mississauga, Canada) fut utilisé puis ces dernières furent analysées à l'aide du logiciel winMDI 2.9.

D. Test d'activation de l'hybridome T 2.102

Des essais d'activation de l'hybridome T 2.102 ont été effectués afin d'évaluer la capacité des CPA transfectées avec nos différentes constructions à stimuler l'alloréactivité. Pour ce faire, de 100 à 10 000 cellules transfectées furent cultivées en présence de $2,5 \times 10^5$ hybridomes T 2.102 sur une période de 24 heures. Ces co-cultures furent effectuées dans des plaques 96 puits, contenant 200 µl par puits de milieu RPMI-1640 contenant 10% de SBV et 1% de 2-mercaptoéthanol. Par la suite, 100 µl de surnageant fut recueilli, puis congelé à -80°C.

L'activation des hybridomes T 2.102, fut par la suite évaluée de façon indirecte à l'aide de la quantité relative d'IL-2 sécrétée par ces derniers lors de cette co-culture. Ainsi après avoir décongelé les surnageants, la quantité relative d'IL-2 s'y trouvant fut évaluée en utilisant la lignée CTLL-2, dépendante de l'IL-2 pour sa prolifération. Lors de ces tests, 5 000 CTLL-2 furent déposées par puits d'une plaque 96 puits. Après une première incubation de 24 heures à 37°C et 5% CO₂, la prolifération des CTLL-2 fut alors évaluée en déposant 20 µl (0,4 µCi/puits; 1µCi = 37kBq) de thymidine tritiée [*methyl*-³H] (MP Biomedicals United States, Solon, USA) par puits. Après 18 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, l'incorporation de la thymidine tritiée fut mesurée à l'aide d'un lecteur à scintillation Wallac MicroBeta Trilux 1450 (Global Medical Instrumentation Inc, Ramsey, Minnesota, USA) après avoir précédemment filtrées les plaques à l'aide d'un Harvester TOMTEC 96 MACH III (TOMTEC, Hamden, CT, USA).

II. Quantification de l'expression de GPR128 dans différentes populations cellulaires de la rate

A. Isolation et purification des populations

Les différentes populations furent isolées à partir de rates de souris B6.AKR mâles. Les rates fraîches furent broyées, resuspendues dans 5 ml de RPMI-1640 puis filtrées sur un tamis cellulaire de 100 μ m (BD Bioscience, Mississauga, Canada). Par la suite les cellules furent soumises à une lyse érythrocytaire à l'aide de tampon ACK (0,15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA). Les cellules furent, par la suite, lavées à l'aide de milieu RPMI-1640.

Les cellules furent ensuite incubées avec des billes magnétiques (CD4, CD8, CD11c, CD11b, CD19) Microbeads Macs (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), selon le protocole du manufacturier. Dans le cas de la purification de la population CD11b, la procédure indirecte fut suivie et a requis l'utilisation de billes streptavidines.

Les cellules marquées furent par la suite purifiées sur des colonnes MS (CD11c et CD11b) et LS (CD4, CD8 et CD19) selon le protocole du fabricant. Les fractions positives furent récoltées et leur pureté fut évaluée en cytométrie en flux.

B. Extraction d'ARN

Les expériences visant à déterminer le niveau d'expression de GPR128 à partir de rates totales et des différentes populations purifiées ont été réalisées avec de l'ARN total extrait à l'aide de la trousse 'High Pure RNA Isolation Kit' (Roche Diagnostics, Laval, Canada) et selon le protocole fourni par le manufacturier.

C. Synthèse d'ADN complémentaire

La synthèse d'ADNc est présentée à la section VI.A.2 de la présente section.

D. RT-PCR quantitatif

Lors de l'évaluation du degré d'expression de GPR128, dans diverses populations cellulaires, la trousse PerfeCTa™ SYBR® Green SuperMix (Quanta BioSciences, Inc, Gaithersburg, USA) fut utilisée. Chaque réaction contenait 10 μ l de mélange de SYBR® Green SuperMix, 1 μ l de mélange d'amorces 10 μ M (**Tableau 5**), 7 μ l d'eau MiliQ stérilisée puis 2 μ l d'ADNc. Le système de PCR en temps réel utilisé

fut le modèle Mx3000P® QPCR (Stratagene, La Jolla, USA). Le degré d'expression de GPR128 fut évalué en fonction du degré d'expression de la glyceraldehyde 3-phosphate déhydrogénase (GAPDH). Les données obtenues ont ensuite été traitées selon la méthode de comparaison des C_t et répondant à l'équation $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tableau 6: Amorces utilisées lors de l'évaluation du degré d'expression de GPR128 par PCR en temps réel.

#	Nom	Polarité	Séquence 5' -->3'
1	GPR128 27370236a2 5'	+	TGGCGGAACCTGGCAAAAT
2	GPR128 27370236a2 3'	-	AGAGGGTCCATATCTGCCCAC
3	GPR128 27370236a3 5'	+	TGTGCAATGTTTCTGAGTTTGGA
4	GPR128 27370236a3 3'	-	GCACTTGCTGTTTGTTGTTTA
5	GAPDH 5'	+	CATGTTCCAGTATGACTCCACTC
6	GAPDH 3'	-	GGCCTCACCCCATTTGATGT

RÉSULTATS

I. Clonage de GPR128

Afin d'évaluer l'implication du gène *GPR128* (**Figure 13**) dans l'alloréactivité du TCR 2.102 contre le CMH II I-E^P, nous avons entrepris le clonage de ce gène dans un vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo. Ceci dans le but d'augmenter l'expression de cette protéine d'intérêt dans des cellules exprimant un CMH de classe II I-E^P. *GPR128* est un gène complexe composé de 16 exons et dont la séquence codante comprend 2701 pb (**Figure 13**). Différentes amorces ont été synthétisées afin de pouvoir réaliser l'amplification du cadre de lecture ouvert de *GPR128*, générant ainsi un segment de 2355pb (**Figure 13**).

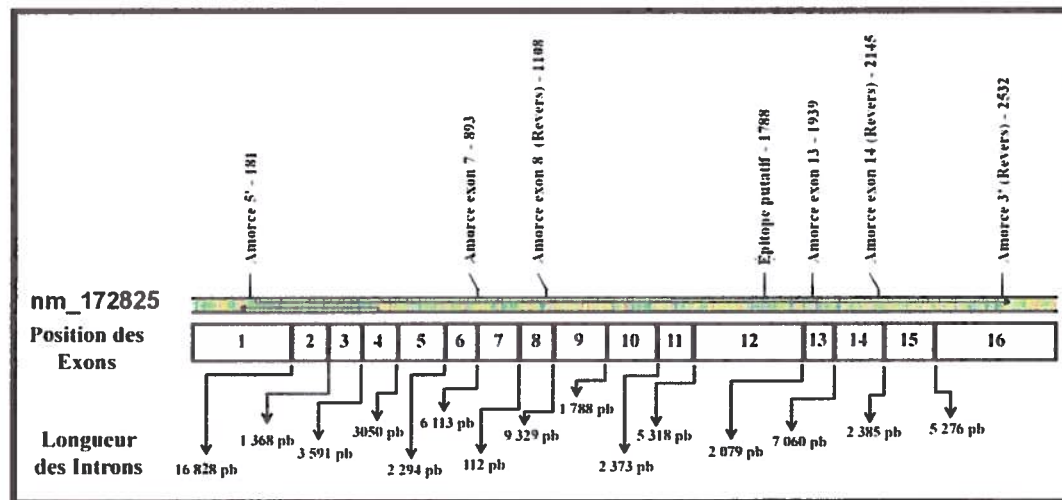


Figure 13: Segment codant de GPR128 et organisation des exons et introns.

La séquence codante de *GPR128* (numéro de référence NCBI : NM_172825) comporte 2701 pb et est codée par 16 exons. Le cadre de lecture ouvert, codant pour la protéine *GPR128*, débute à la position 198 et se termine à la position 2555. L'amplification du gène pour le clonage s'est effectué à l'aide des amorces 5' et 3', générant ainsi un segment de 2355 pb.

A. Amplification de la séquence codante de GPR128

1. Amplification en une seule étape.

Pour les fins du clonage, la première stratégie employée proposait l'amplification de la séquence codante complète du gène d'intérêt (**Figure 13**), puis son insertion dans un vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo. Le schéma décrivant cette approche de clonage est illustré ci-dessous (**Figure 14**).

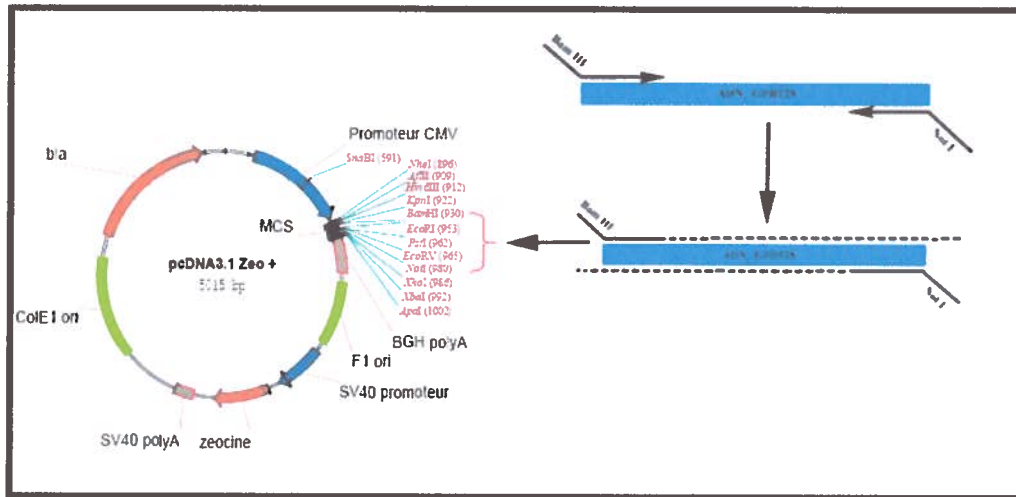


Figure 14: Stratégie initiale de clonage de GPR128 dans un vecteur pcDNA3.1/Zeo

Lors de cette approche, des amorces comportant des sites de restrictions Bam HI et Not I furent utilisées afin d'amplifier la section codante de GPR128 et de l'insérer dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo.

Cependant, l'amplification de GPR128 dans son intégralité n'a pas été possible avec les paramètres initiaux (puits #3 : **Figure 15**). L'utilisation de différentes paires d'amorces permettant des amplifications partielles de la séquence codante de GPR128 nous a permis de tenter d'identifier la source du problème. L'amplification du segment se situant entre les exons 7 et 8 de GPR128 nous indiqua que l'ADNc complémentaire de GPR128 se trouvait en nombre suffisant pour réussir une amplification (puits #4 : **Figure 15**). L'amplification du segment se situant entre l'extrémité 5' et l'exon 8 de GPR128, quant à lui, nous indiqua que l'amorce 5' fonctionnait correctement aux paramètres utilisés (puits #1 : **Figure 15**). D'autre part, l'amplification du segment se situant entre l'exon 7 et l'extrémité 3' de GPR128 nous indiqua le bon fonctionnement de l'amorce située à l'extrémité 3' (puits #2 : **Figure 15**). Toutefois, le faible rendement de l'amplification du fragment #2 (puits #2 : **Figure 15**) semblait nous indiquer une problématique avec l'amorce de l'extrémité 3'.

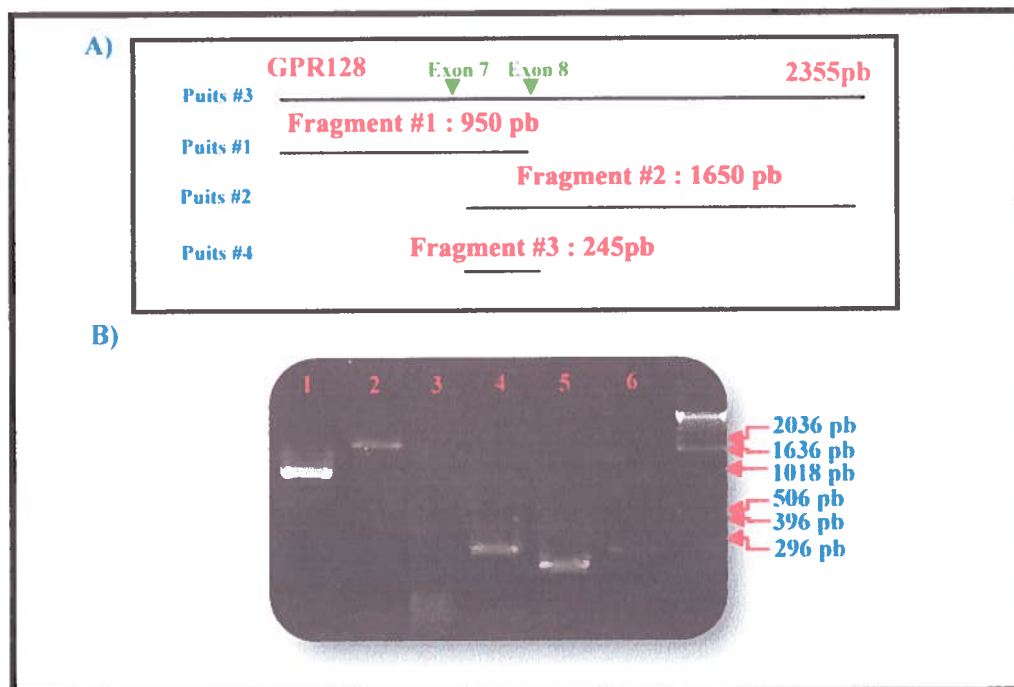


Figure 15 : L'amplification de GPR128, intégral et partiel, à partir d'une matrice d'ADNc

A) Schématisation des produits de PCR de GPR128 effectués. B) Amplification à l'aide de l'amorce GPR128 3'. Le contenu des puits fut le suivant : 1- Amorces GPR128 5' et exon 8. 2- Amorces exon 7 5' et GPR128 3'. 3- Amorces GPR128 5' et GPR128 3'. 4- Amorces exon 7 5' et exon 8 3'. 5- Amorces GAPDH. 6- Témoin sans ADN. La température d'hybridation utilisée fut fixée à 55°C.

2. Optimisation des conditions

L'amplification de GPR128 dans son intégralité n'ayant pas pu être réalisée à l'aide des paramètres précédents, nous avons par la suite tenté d'optimiser la concentration de $MgCl_2$ contenue dans le mélange de réactif utilisé. Toutefois, bien que les concentrations en $MgCl_2$ furent testées sur une gamme se situant entre 1,5 mM et 4 mM, aucune condition ne permit l'amplification de GPR128 dans son intégralité (résultats non montrés). De plus, nous avons tenté d'optimiser la température d'hybridation de la réaction en effectuant des PCR gradients. Cependant, la variation de la température d'hybridation sur une gamme variant entre 41°C et 61,5°C ne permit pas d'identifier de condition améliorant l'amplification de GPR128 intégrale (résultats non montrés).

3. Tentative de PCR à extension par chevauchement

L'ensemble des tentatives d'amplification de GPR128 lors d'une seule et même étape ayant toutes échouées, nous avons tenté de scinder la séquence codante de GPR128 en trois segments (**Figure 16**), ceci dans le but de tenter une amplification

par la technique de PCR d'extension par chevauchement. Une fois les fragments obtenus, lors d'une première amplification, ces derniers furent ensuite utilisés lors d'une seconde amplification afin d'obtenir la séquence codante intégrale de GPR128.

Le premier fragment, d'une longueur de 950 pb, constituait la portion située entre l'extrémité 5' et l'exon 8 de GPR128 (puits #1 : **Figure 16**). Le second fragment, d'une longueur de 1,2 Kb, comprenant une partie chevauchante avec le premier fragment sur 239 pb, était constitué de la portion du gène située entre les exons 7 et 14 (puits #2 : **Figure 16**). Quant au troisième segment amplifié, d'une longueur de 617 pb, comprenant une partie chevauchante avec le second segment sur 233 pb, il était constitué de la portion entre l'exon 13 et l'extrémité 3' de GPR128 (puits #3 et 4 : **Figure 16**). Suspectant un problème avec l'amorce situé à l'extrémité 3' de GPR128, nous avons effectué deux amplifications différentes de ce fragment. Le premier (puits #3 : **Figure 16**), fut amplifié à l'aide de l'amorce utilisée antérieurement et comportant un site de restriction Not I, alors que le second (puits #4 : **Figure 16**) fut amplifié à l'aide d'une amorce comportant une extrémité franche.

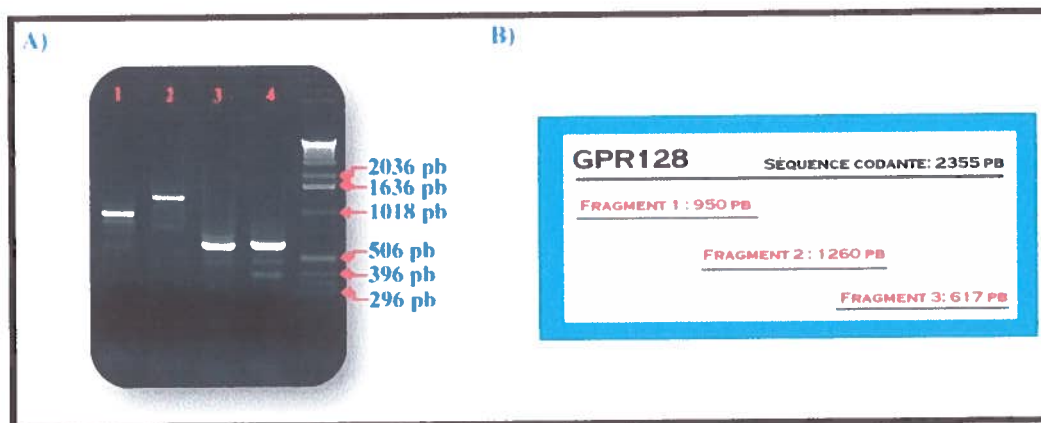


Figure 16: Amplification de GPR128 en 3 segments

Les 3 fragments (B) ont été amplifiés de façon à posséder des extrémités chevauchantes. (A) L'amplification fut effectuée à l'aide d'une concentration en $MgCl_2$ fixée à 1,5 mM et une température d'hybridation fixée à 50°C. Le contenu des puits fut le suivant : 1 - GPR128 5' jusqu'à l'exon 8 (950 pb). 2- GPR128 de l'exon 7 à l'exon 14 (1260 pb). 3- GPR128 de l'exon 13 à l'extrémité 3' coupé de façon franche (617 pb). 4- GPR128 de l'Exon 13 à l'extrémité 3' de GPR 128 à l'extrémité cohésive Not I (617 pb).

Les 3 segments de GPR128, amplifiés précédemment (**Figure 16**), furent purifiés sur gel puis servirent de matrice afin d'amplifier GPR128 de façon intégrale selon la technique d'extension par chevauchement (**Figure 17**). Cependant, l'amplification du GPR128 intégrale engendra un produit de PCR incomplet et non spécifique (puits #1 et 2 : **Figure 17**). De plus, la réaction de PCR sur une matrice composée des 2 premiers fragments uniquement engendra un produit de PCR non spécifique et identique à celui engendré par la réaction réalisée sur une matrice composée des 3 fragments (puits #3; **Figure 17**). Toutefois, l'utilisation des 2 derniers fragments, avec ou sans site de restriction Not I, engendra une très faible amplification du fragment attendu (1,6 Kb) (puits #4 et 5 : **Figure 17**).

La première tentative étant infructueuse, nous avons alors effectué une seconde réaction PCR par chevauchement en appliquant la méthode du PCR par essais ou *touchdown pcr* (**Figure 17 B**). Par l'utilisation de cette technique nous espérions augmenter les chances d'obtenir des amplicons spécifiques. Les éléments contenus dans les diverses réactions furent alors les mêmes que dans la première tentative (**Figure 17 A**), toutefois le programme de PCR utilisé différa par une baisse de la température d'hybridation après chaque cycle. La température d'hybridation initiale fut de 75°C et diminua jusqu'à 57°C au fur et à mesure de la progression des cycles.

Puis, une répétition de 18 cycles à 50°C fut utilisée afin de compléter la réaction de polymérisation. Malheureusement, les profils des produits de PCR obtenus furent alors identiques à ceux obtenus précédemment (**Figure 17 A et B**).

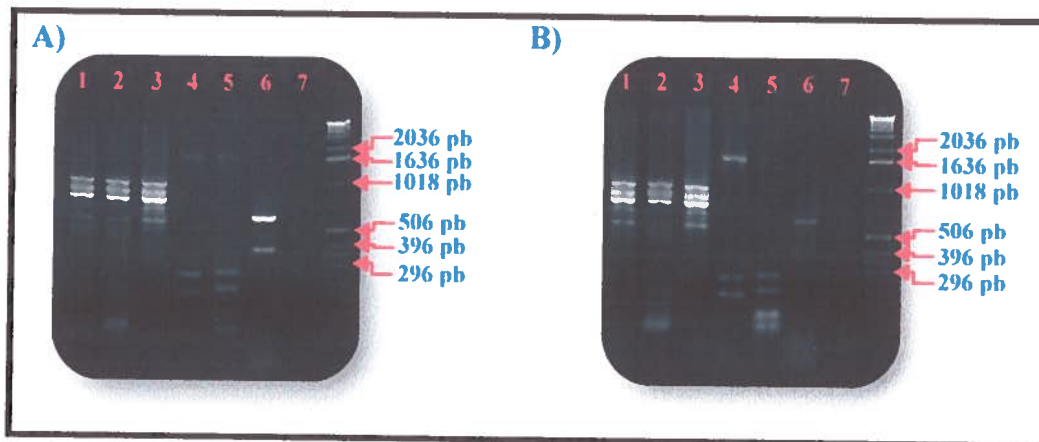


Figure 17: Différentes combinaisons d'extension par chevauchements

A) Extension par chevauchements où la température d'hybridation fut fixée à 50°C. B) Extension par chevauchements réalisée à l'aide de la technique de PCR par essais (Touchdown). Dans les deux cas (A et B), la matrice des réactions PCR fut composée de différentes combinaisons des 3 fragments. Quant aux amorces utilisées, elles furent identiques à celles employées pour l'amplification de ces 3 fragments. Le contenu des puits fut le suivant : 1- Matrice composée des 3 fragments de GPR128 dont le 3^e fragment comporte une extrémité franche. 2- Matrice composée des 3 fragments de GPR128 dont le 3^e fragment comporte une extrémité cohésive (Not I). 3- Matrice composée des 2 premiers fragments de GPR128. 4- Matrice composée des 2 derniers fragments de GPR128 dont le 3^e fragment comporte une extrémité franche. 5- Matrice composée des 2 derniers fragments de GPR128 dont le 3^e fragment comporte une extrémité cohésive (Not I). 6- Témoin positif sur une matrice d'ADN_c à l'aide des amorces utilisées pour l'amplification du 3^e fragment à extrémité cohésive (Not I). 7- Témoin négatif.

B. Stratégie de clonage de GPR128 via clonage successif dans pBluescript SK II (-) phagemid

Face à notre incapacité à amplifier GPR128 dans son intégralité, nous avons alors opté pour une stratégie de clonage réalisée en plusieurs étapes successives. Pour ce faire, le gène GPR128 fut amplifié en trois fragments distincts dont chacun possédant des sites de restriction à ses extrémités permettant son insertion dans un vecteur pBluescript II SK (-) (**Figure 18**). Par la suite, GPR128 a pu être extrait du vecteur afin de l'insérer dans celui de notre choix.

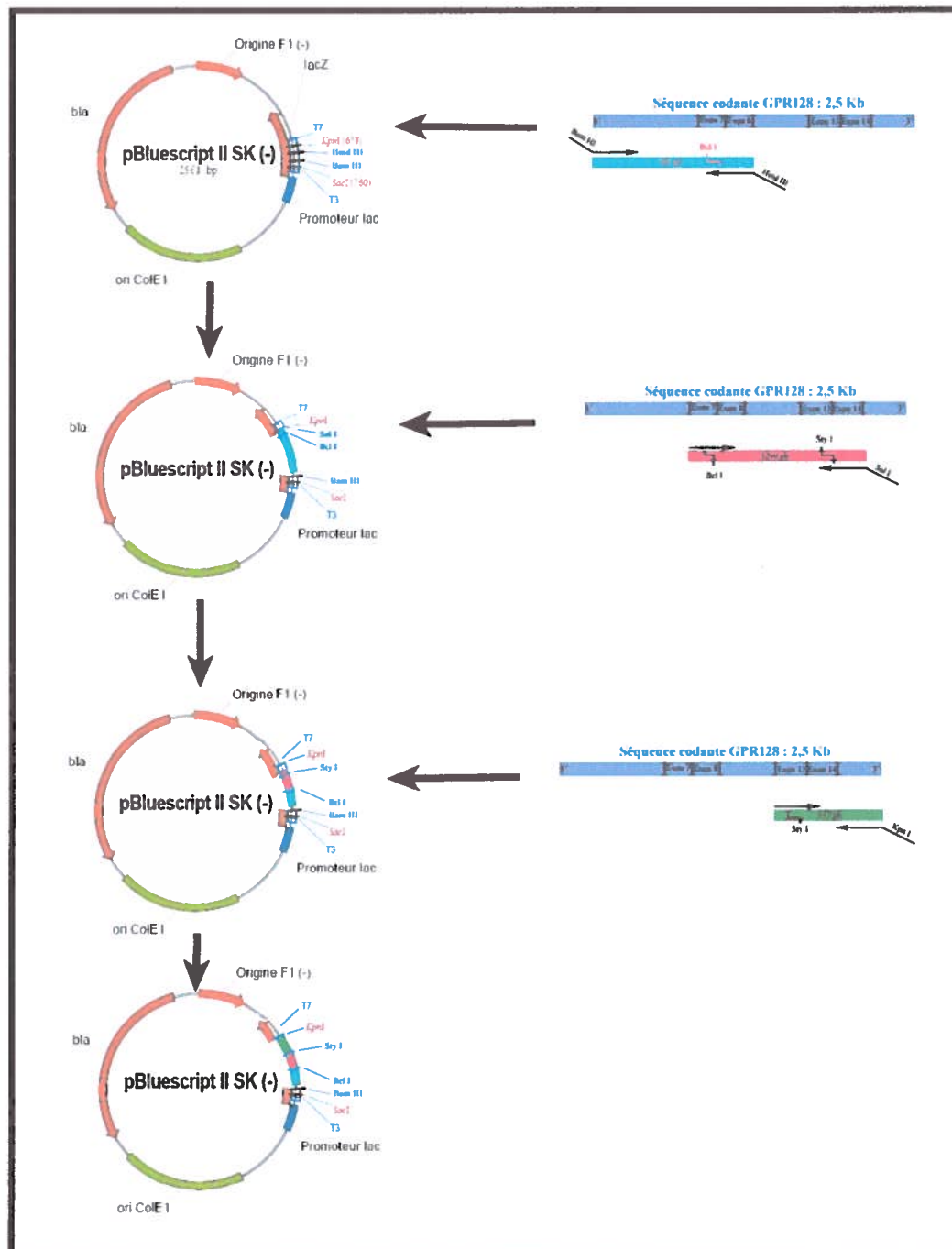


Figure 18: Clonage de GPR128 de façon successive dans un vecteur pBluescript II SK (-) phagemid

1. Clonage

Les trois segments de GPR128 furent amplifiés à l'aide de nouvelles amorces comportant les sites de restrictions nécessaires sur des parties flottantes. Le premier segment, d'une longueur de 950 pb (puits #1 : **Figure 19 A**), fut inséré dans le vecteur pBluescript II SK(-) à l'aide des sites Bam HI en 5' et Hind III en 3'. Alors que le

second segment, d'une longueur de 1,2 Kb (**Figure 19 A**), fut ajouté au premier à l'aide d'un site Bcl I situé dans la portion chevauchante avec le premier segment et le site de restriction Sal I en 3'. Quant au troisième segment, d'une longueur de 617 pb (**Figure 19 A**), ce dernier fut ajouté à l'aide d'un site Sty I dans la portion chevauchante avec le second fragment le site Kpn I en 3'. Les clones sélectionnés après ces insertions furent confirmés par digestion afin de valider la présence de ces 3 fragments de GPR128 (**Figure 19 B**), puis préparés de façon à faire séquencer les constructions.

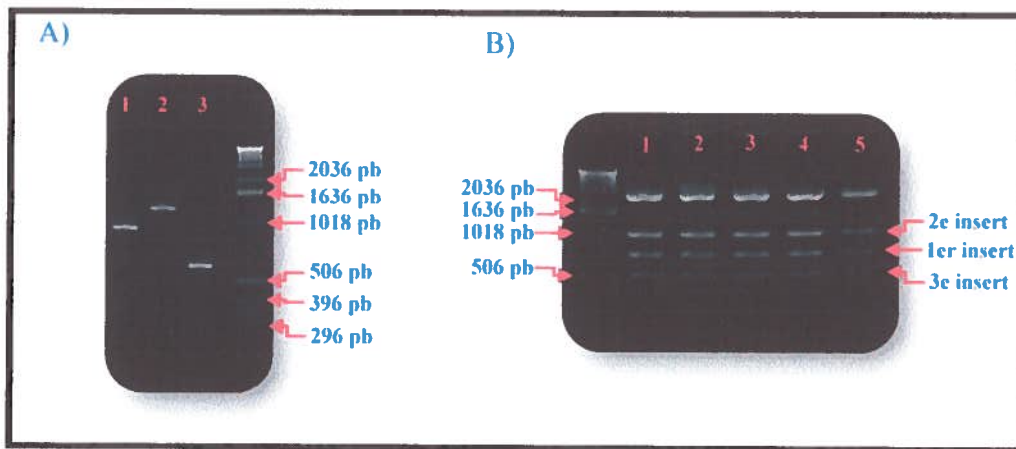


Figure 19 : Clonage de GPR128 de façon successive dans un vecteur pBluescript II SK (-) phagemid

Le clonage de GPR128 s'est effectué en plusieurs étapes successives. A) Amplification des 3 fragments de GPR128 nécessaires au clonage successif. Le premier segment (puits #1) est de l'ordre de 950 pb, le second (puits #2) est de 1,2Kb alors que le dernier (puits #3) est de l'ordre de 617 pb. B) Confirmation de l'insertion des trois fragments par digestions Bam HI, Bcl I, Sty I et Kpn I. Le premier fragment correspond à un segment de 760 pb, le second fragment correspond à un segment de 1230 pb alors que le dernier fragment correspond à un segment de 530 pb.

2. Résultats du séquençage de la construction pBluescript II GPR128

Deux mutations (**Figure 20 A et B**) furent retrouvées à l'intérieur de notre construction et ce pour tous les clones obtenus.

Lors de l'analyse de l'alignement des séquences obtenues avec la séquence issue de l'ARNm de GPR128 (publiée sous le # nm_172825), tous les clones ont présenté une transition impliquant la thymidine de la position 1080 de la séquence

publiée (**Figure 20 C**). Cette dernière s'est traduite par la substitution d'une phénylalanine par une leucine (**Figure 20 E**).

Quant à la position 1222 de la séquence nm_172825, l'insertion d'une adénine (**Figure 20 D**) engendra un décalage du cadre de lecture en amont de l'épitope putatif de GPR128.

Ces deux mutations se trouvant entre deux sites de restriction (Xho I et SnaBI), nous avons tenté une réparation du clone. La portion de la séquence codante de GPR128 située entre ces deux sites fut amplifiée à partir d'ADNc issus de deux souris sur fonds génétique B6 indépendantes. La première provenant d'une lignée de souris B6.AKR et la seconde provenant d'une lignée de souris B6.12952-Tcra^{tm1Mom}. Nous avons ici utilisé deux lignées distinctes afin de déterminer si la présence de ces mutations n'était pas attribuable à l'utilisation de la lignée B6.AKR. La séquence où se trouvait les mutations fut ainsi retirée puis remplacée par les séquences issues de ces deux lignées de souris. Cependant, dans les deux cas, les mutations ont été retrouvées aux mêmes endroits (résultats non montrés), suggérant ainsi que le problème proviendrait de la transcriptase inverse elle-même.

Le segment d'ADN génomique (souris B6.12952-Tcra^{tm1Mom}) correspondant à la position de l'insertion de l'adénine (1222) fut donc cloné dans un vecteur pBluescript afin de le séquencer, ceci dans le but de déterminer le rôle de la transcriptase inverse dans la génération de cette mutation.

Les résultats du séquençage de la portion de l'ADN génomique comportant la position 1222 de la séquence nm_172825 démontrèrent un alignement parfait et l'absence de l'insertion de l'adénine observée précédemment, suggérant alors la transcriptase inverse comme responsable de l'insertion.

Parallèlement à ces travaux, l'alignement entre la séquence génomique publiée (NT_039624.7) et la séquence issue de l'ARNm de GPR128 (nm_172825) nous a permis de mettre à jour une erreur dans la séquence publiée nm_172825. La position 1080 de la séquence nm_172825 devrait être une cystéine et non une thymidine.

Ainsi donc, la mutation de transition retrouvée à la position 1080 de la séquence nm_172825 s'est avérée n'être qu'une erreur dans la séquence de l'ARNm publiée. Toutefois, le décalage du cadre de lecture induit par l'insertion d'une adénine en amont de l'épitope putatif de GPR128 semble être attribuable à la transcriptase inverse utilisée. Cette mutation pourrait être corrigée par mutagenèse dirigée, toutefois pour des fins d'économie de temps nous avons préféré nous concentrer sur la

confirmation de la stimulation de l'alloréactivité du TCR 2.102 induit par l'épitope putatif de GPR128 (GPR128(531-545)).

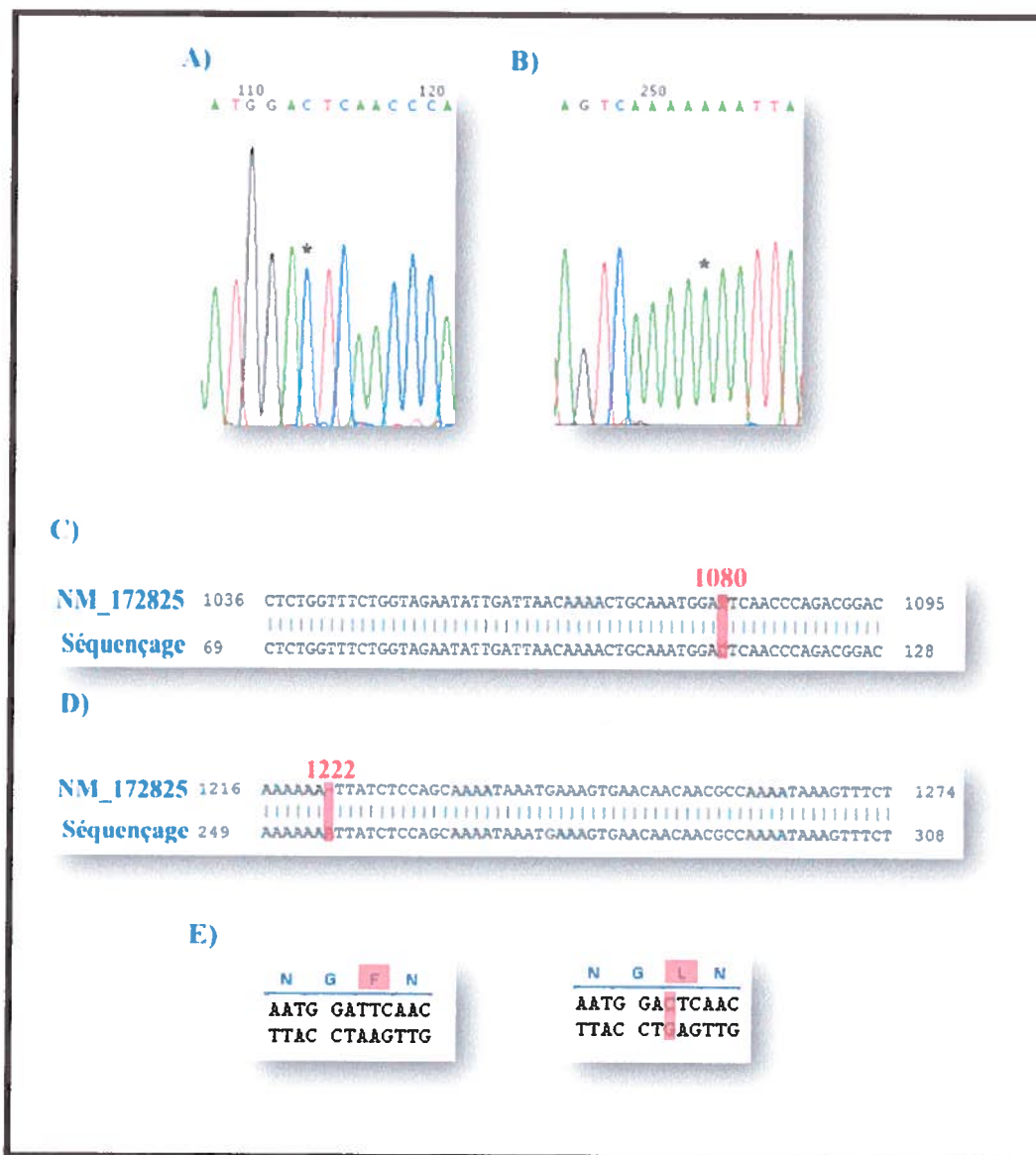


Figure 20: Mutations retrouvées lors des séquençages des clones pBluescript GPR128

Les histogrammes issus du séquençage des différents clones pBluescript GPR128, illustrent la mutation ponctuelle d'un T pour un C (A) ainsi que le décalage du cadre de lecture induit par l'addition d'une adénine (B). Ces mutations furent révélées (C et D) lors de l'alignement des séquences obtenues avec la séquence de GPR128 (nm_172825). La mutation ponctuelle, retrouvée à la position 1080 de GPR128, induit la permutation d'une phénylalanine pour une leucine (E).

C. Clonage d'une région de GPR128 contenant l'épitope putatif dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 Zeo/ Ii

1. Élaboration de la construction

Le clonage du gène GPR128 dans son intégralité n'ayant pas fonctionné, nous nous sommes penchés sur le clonage d'un segment de ce dernier comprenant l'épitope putatif. De cette façon nous avons pu évaluer la capacité des cellules exprimant des CMH II I-E^P à apprêter et présenter l'épitope putatif de GPR128 en évitant l'amplification des portions problématiques de GPR128. Nous avons utilisé pour ce faire la construction pcDNA3.1/Zeo Ii qui fut déjà utilisée dans le laboratoire afin d'exprimer certains épitopes dans des lignées cellulaires. L'utilisation de cette construction nous a permis de cibler l'expression de la protéine de fusion (Ii-GPR128) vers les compartiments où sont chargés les CMH de classe II, permettant ainsi un meilleur chargement de l'épitope sur les CMH II I-E^P.

L'épitope putatif comprenant les acides aminés 531 à 545 de GPR128, nous avons utilisé des amorces permettant l'amplification du segment (99 pb) codant pour la section 526 à 559 (**Figure 21**). Puis à l'aide de sites BamHI, situés de part et d'autre de nos amplicons, nous avons inséré ces derniers dans la construction pcDNA3.1/Zeo Ii.

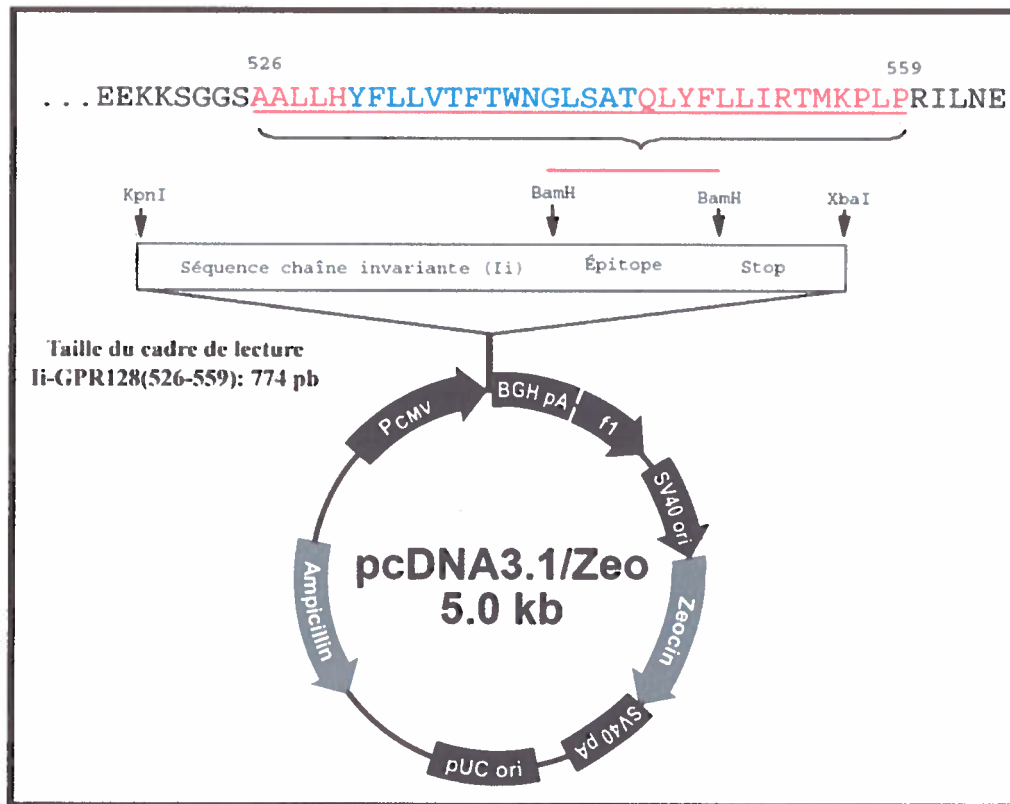


Figure 21: Stratégie de clonage d'une section de GPR128(526-559) contenant l'épitope putatif (531-545)

Le segment de GPR128 comprenant les acides aminés 526 et 559 fut amplifié par PCR. Ce dernier fut par la suite inséré dans le vecteur d'expression pcDNA3.1/Zeo Ii. Le positionnement de l'épitope minimal (531-545) est illustré en bleu.

2. Transfection de la lignée CHO-E^p à l'aide de lipofectamine™ 2000.

Afin de confirmer le rôle de l'épitope putatif de GPR128 dans l'alloréactivité du TCR 2.102 contre I-E^p, des fibroblastes d'ovaires de hamsters (CHO) présentant un CMH de classe II I-E^p furent transfectés à l'aide de la construction exprimant la chaîne invariante (Ii) en fusion avec GPR128(526-559). Les cellules CHO-E^p furent transfectées à l'aide de Lipofectamine™ 2000.

La mise au point de la technique a nécessité l'essai de plusieurs conditions différentes, jusqu'à l'obtention des paramètres optimaux. La transfection des cellules CHO-E^p à l'aide de la construction pcDNA3.1/Zeo GFP et de ces paramètres ont permis l'obtention d'une viabilité cellulaire de 82% et une efficacité de transfection de 23% (Figure 22).

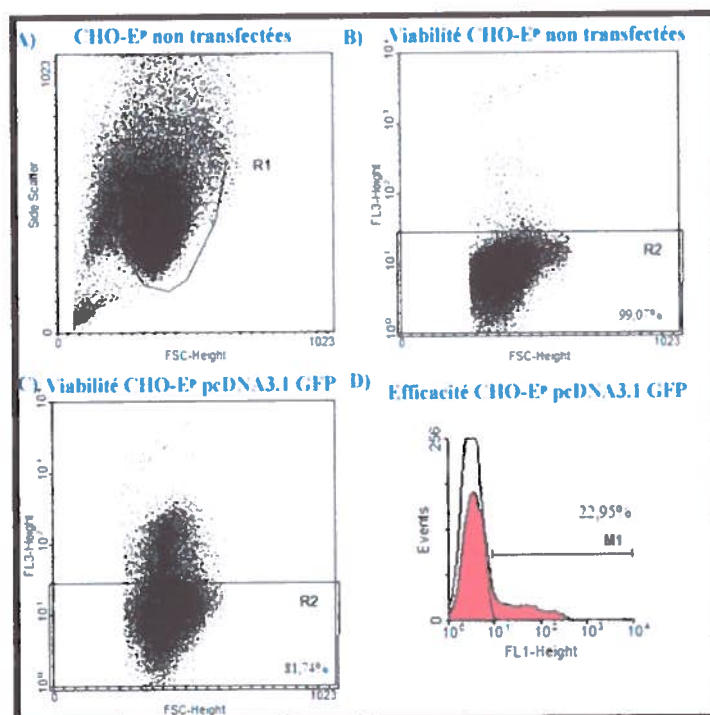


Figure 22: Efficacité de transfection et viabilité engendrées par la transfection à la Lipofectamine™ 2000 de la construction pcDNA3.1/Zeo GFP

Afin de vérifier l'efficacité de transfection et la viabilité cellulaire, après 24 heures, les cellules furent marquées au PI puis analysées en cytométrie en flux. Le pourcentage de transfection fut estimé par l'évaluation du signal de la GFP recueillis en FL1 à l'intérieur de la population de cellules vivantes (FL3 négatives).

3. Tests d'activation de l'hybridome T 2.102 via l'utilisation de la construction pcDNA3.1 li GPR128(526-559)

Dans un premier temps, la construction pcDNA3.1/Zeo li GPR128(526-559) clone A fut transfectée dans des cellules CHO-E^P à l'aide de Lipofectamine™ 2000. Ces cellules furent incubées 24 heures en co-culture avec l'hybridome T 2.102, puis le surnageant fut récolté et mis en présence de CTLL-2 afin d'évaluer leur prolifération.

Toutefois nous avons pu observer que la transfection de GPR128(526-559) dans des cellules CHO-E^P induisait une activation du TCR 2.102 (2000 CPM) comparable à celle observée avec la construction témoin li (Figure 23 A et C), ce qui démontre une absence de stimulation due à l'expression de GPR128(526-559). Le bon fonctionnement du système de transfection et d'expression, quant à lui, fut démontré par l'utilisation de la construction pcDNA3.1/Zeo li-EPM. La transfection de cette dernière permit l'obtention d'une forte stimulation de l'hybridome T 2.102 (Figure 23

B), confirmant ainsi la capacité des CHO-E^P à stimuler l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 lorsque qu'un épitope adéquat y est présenté.

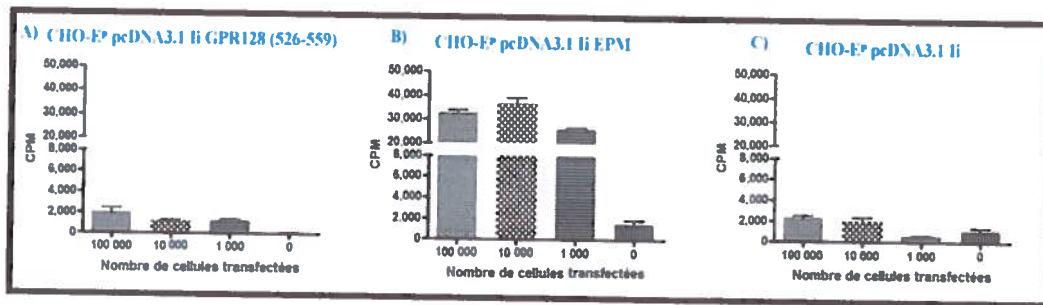


Figure 23: Activation de l'hybridome T 2.102, stimulé par des CHO-E^P transfectée à l'aide de la construction Ii-GPR128(526-559) et mesuré par la prolifération de la ligné CTLL-2

Lors de ce test d'activation, le clone A de la construction pcDNA3.1 Ii GPR128(526-559) fut utilisé.

D. Confirmation de l'activation de l'hybridome T 2.102 par la présentation de l'épitope minimal par un complexe CHM II I-E^P

L'expression, dans des cellules CHO-E^P, de GPR128(526-559) clone A en fusion avec Ii étant incapable d'induire une activation du TCR 2.102, nous avons voulu confirmer que l'épitope putatif minimal (531-545) en fusion avec Ii était apte à induire une activation du TCR 2.102. En effet, Félix et collaborateurs avaient déjà publié en 2006 des résultats démontrant que la séquence synthétique GPR128(531-545) était apte à restituer l'alloréactivité du clone T 2.102 contre I-E^P (Felix et al. 2006).

1. Élaboration des constructions minimales en fusion avec Ii

Pour y arriver nous avons donc élaboré deux constructions en fusion avec Ii (Figure 24). Elles furent réalisées par PCR à l'aide d'amorces comportant, dans leurs sections flottantes, les séquences à ajouter à une matrice pcDNA3.1/Zeo Ii. Alors que la première construction fut constituée de la séquence exacte de GPR128 codant pour les acides aminés 531 à 545, les 3 premiers acides aminés de la séquence de la seconde construction furent mutés. Cette substitution des acides aminés 531 à 533 fut utilisée ici afin de corroborer des résultats publiés démontrant l'augmentation du potentiel alloréactif de cette séquence contre I-E^P faisant suite à l'augmentation de la solubilité de l'épitope ainsi modifié (Felix et al. 2006).

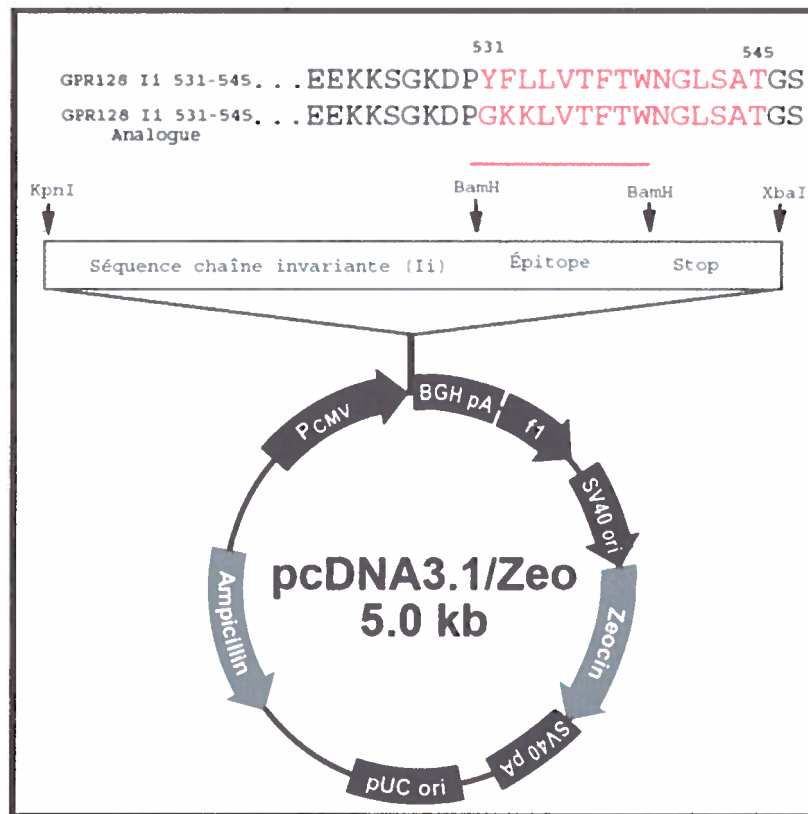


Figure 24: Schématisation des deux constructions pcDNA3.1/Zeo Ii GPR128(531-545) et son analogue

Les constructions furent élaborées à l'aide d'amorces comportant les sections à ajouter dans leurs segments flottants. Après la PCR, la matrice composée de la construction pcDNA3.1/Zeo Ii fut éliminée par deux digestions Dpn I. Le produit de PCR fut par la suite ligué sur lui-même et transformé dans des bactéries compétentes. La section des séquences en rouge correspond à la portion entre les deux sites Bam HI. La séquence en noir précédant l'épitope correspond à la fin de Ii.

2. Transfection des cellules CHO-E^p à la lipofectamine 2000 et test d'activation sur l'hybridome T 2.102.

Tout comme présenté à la section I.C.2 des résultats, nous avons transfectée des cellules CHO-E^p à l'aide des constructions pcDNA3.1/Zeo Ii GPR128(531-545) et son analogue. Par la suite, nous avons réalisé un test d'activation de l'hybridome T 2.102. Nous avons alors observé une légère activation spécifique induite par l'expression de la construction GPR128(531-545) (**Figure 25 A**). Quant à l'expression de l'analogue de GPR128(531-545), ce dernier engendra une forte activation du TCR

2.102 (**Figure 25 B**), confirmant ainsi la capacité de l'épitope minimal de GPR128 à activer le TCR 2.102 lorsque présenté dans un contexte CMH II I-E^P.

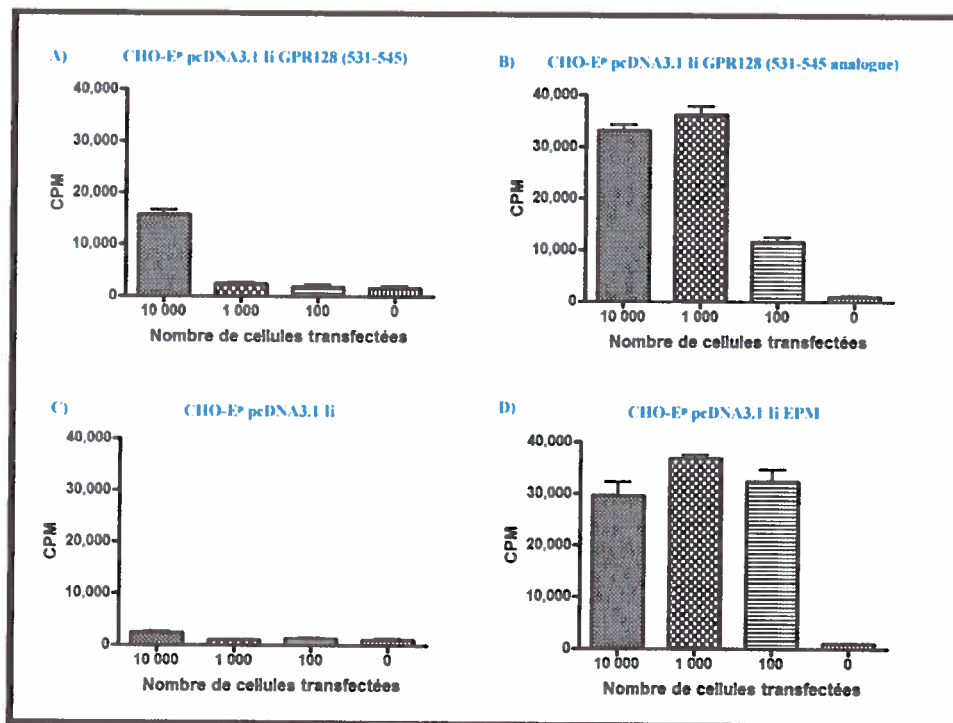


Figure 25 : Activation de l'hybridome T 2.102 à l'aide de l'expression des constructions pcDNA3.1/Zeo Ii GPR128(531-545) et de son analogue dans des CHO-E^P

E. Modulation de la présentation de l'épitope minimal par ses extensions amino et carboxy-terminales

1. Élaboration des constructions tronquées.

L'activation du TCR 2.102 par la présentation de GPR128(531-545) ayant été confirmée, nous nous sommes par la suite interrogés sur les raisons empêchant l'expression de GPR128(526-559) d'en faire autant. Nous avons alors élaboré des constructions n'exprimant que les segments comportant l'épitope minimal avec l'une ou l'autre des deux portions ceinturant ce dernier (**Figure 26**). Ce clonage s'est effectué à l'aide d'amorces engendrant une délétion sur une matrice pcDNA3.1/Zeo Ii GPR128(526-559) du clone A utilisé précédemment.

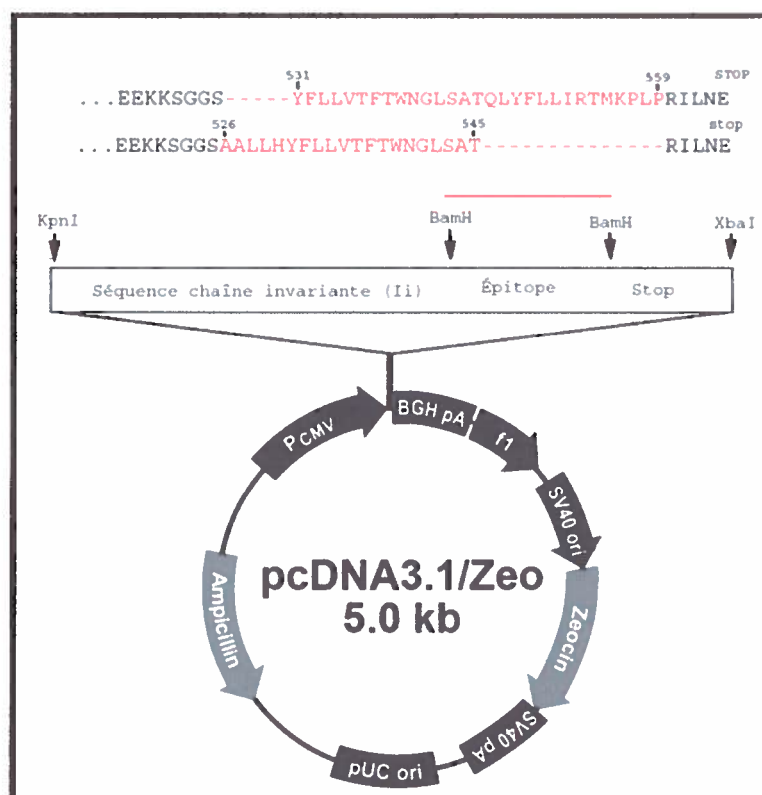


Figure 26: Schématisation des deux constructions pcDNA3.1/Zeo li GPR128(526-545) et (531-559)

Les constructions furent élaborées à l'aide d'amorces, dirigées dans des directions opposées, amplifiant le vecteur (pcDNA3.1 GPR128(526-559) clone A) dans son intégralité mais éliminant une section se trouvant entre les deux. Les sections entre 526-530 et 546-559, visibles en pointillés rouges, furent ainsi éliminées.

2. Test d'activation de l'hybridome T 2.102 à l'aide des constructions tronquées (526-545 et 531-559)

Afin de déterminer si la présence de l'une ou l'autre des portions de GPR128 ceinturant l'épitope minimal (531-545) interfère avec la présentation antigénique, les constructions pcDNA3.1/Zeo li GPR128(526-545 et 531-559) furent transfectées dans des CHO-Ep à l'aide de lipofectamine™ 2000. Puis, nous avons procédé à un test de stimulation de l'hybridome T 2.102.

Ainsi nous avons pu observer, tel que précédemment, que l'expression de la section 526 à 559 de GPR128 en fusion avec li dans des CHO-Ep ne fut pas suffisante afin d'activer l'hybridome T 2.102 (**Figure 27 A**). De plus, l'absence de l'une ou l'autre des sections ceinturant l'épitope minimal (531-545) n'a pas permis de restaurer

l'activation (**Figure 27 B et C**) observée lors de l'expression de pcDNA3.1/Zeo II GPR128(531-545) ou de son analogue (**Figure 25 A et B et Figure 27 D**).

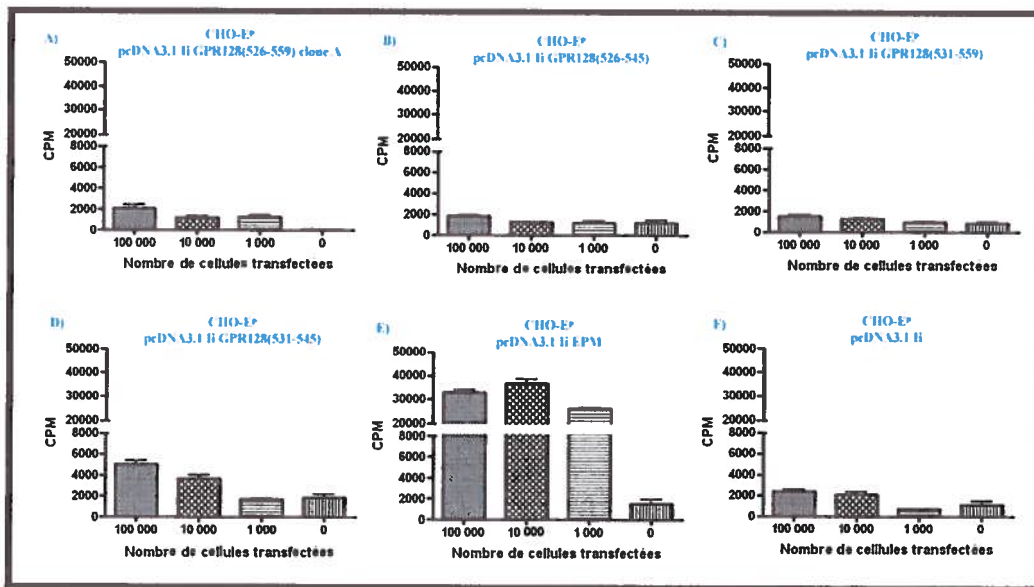


Figure 27: Test d'activation de l'hybridome T 2.102 à l'aide de CHO-Ep exprimant des constructions tronquées de pcDNA3.1 II GPR128(526-559)

Les cellules CHO-Ep furent transfectées ici à l'aide de Lipofectamine™ 2000 à l'aide des constructions élaborées à la section I.E.1.

Ainsi, nous nous sommes retrouvés dans la situation où trois cas de figure restaient à départager. Dans un premier cas, l'utilisation de fibroblaste de Hamster (CHO) n'étant pas des CPA, l'observation de cette interférence pouvait être imputable à une déficience dans leur machinerie de présentation ne leur permettant pas l'apprêtement de plus longs segments. Dans un second cas, les deux séquences ceinturant l'épitope pourraient être toutes deux responsables de cette interférence dans le processus de chargement ou de présentation. Enfin, dans un troisième cas, les constructions dérivées de pcDNA3.1/Zeo II GPR128(526-559) clone A étant distinctes dans leur élaboration à la construction pcDNA3.1/Zeo II GPR128(531-545), la présence de cette interférence pourrait être imputable à une mutation dans la région promotrice des constructions.

F. Transfection des constructions dans des cellules de lymphome B CH27-E^P.

Afin d'évaluer si l'absence d'activation du TCR 2.102 par la présentation de la section 526 à 559 de GPR128, par des cellules CHO-E^P, n'était pas induite par un manquement dans la machinerie de présentation des fibroblastes, nous avons tenté de répéter ces expérimentations à l'aide d'un lymphome B CH27-E^P. Pour y arriver, nous devions en premier lieu mettre au point une méthode de transfection transitoire efficace pour ce type cellulaire. De nombreuses techniques furent donc tentées afin d'identifier celles qui nous permettraient d'obtenir les meilleurs rendements de transfections conjugués à un grand pourcentage de viabilité.

Enfin, c'est avec l'utilisation de la microporation que les meilleurs résultats ont été obtenus. Les premiers tests, ayant eu lieu à l'aide de 0,5 µg de peGFP par réaction, ont permis de mettre au point les paramètres conduisant à l'obtention d'une efficacité de transfection de l'ordre de 76% et à un pourcentage de viabilité supérieur à 62% (**Figure 28**). Ces paramètres furent donc par la suite appliqués aux expérimentations subséquentes.

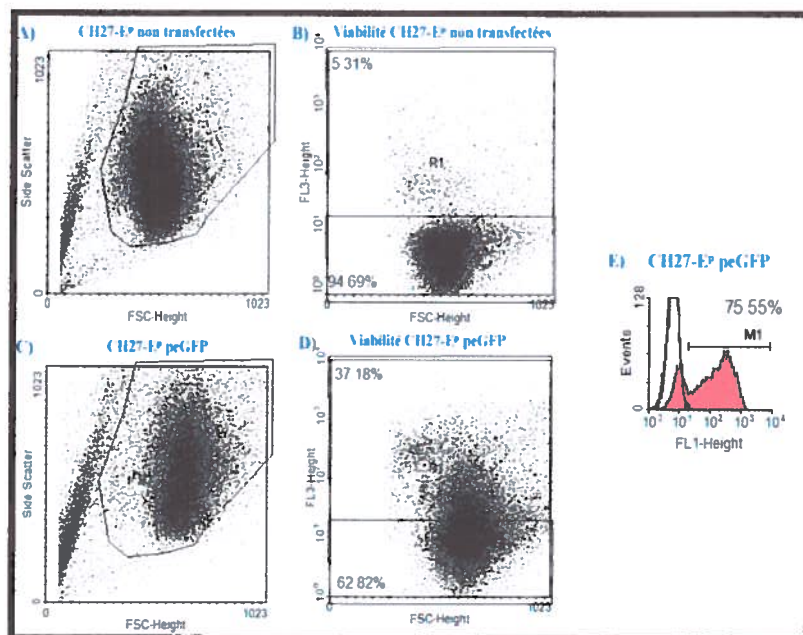


Figure 28: Évaluation de l'efficacité de transfection de la lignée CH27-E^P à l'aide d'une construction peGFP

Analyse, en cytométrie en flux, des cellules CH27-E^P microporées à l'aide de 0,5 µg de peGFP et de 2 impulsions de 10 ms à 1300 volts. Le pourcentage de viabilité fut évalué à l'aide d'un marquage au PI. Le pourcentage de transfection fut estimé par l'évaluation du signal de la GFP recueillis en FL1 à l'intérieur de la population de cellules vivantes (FL3 négatives).

Cependant, lors des premières expérimentations effectuées à l'aide de nos différentes constructions en fusion avec Ii, un témoin de transfection à l'aide de la construction pcDNA3.1/Zeo GFP nous a permis d'observer une baisse importante du rendement (**Figure 29**). Nous avons tout de même poursuivi l'expérience et réalisé le test de stimulation de l'hybridome T 2.102 (**Figure 30**).

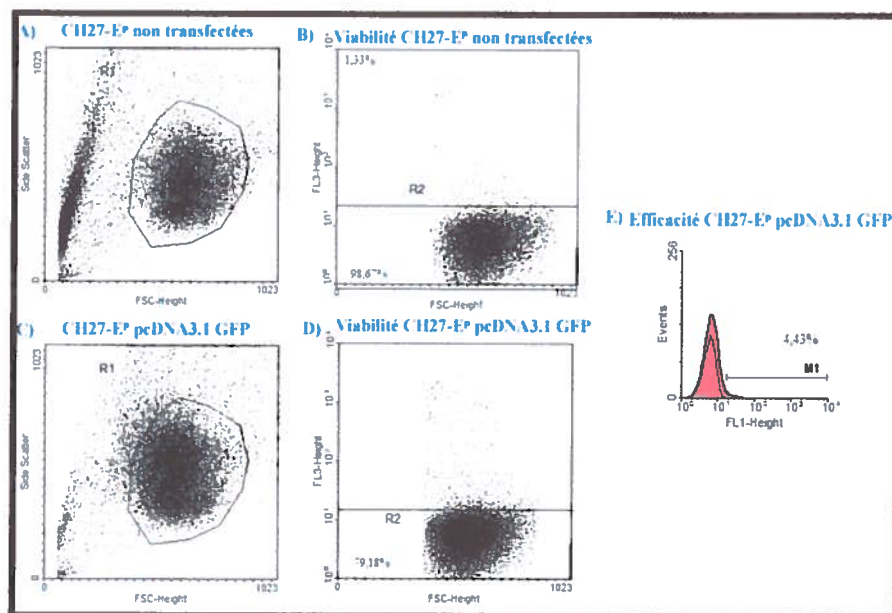


Figure 29: Confirmation de l'efficacité de transfection de la lignée CH27-E^p à l'aide d'une construction pcDNA3.1/Zeo GFP

Analyse, en cytométrie en flux, des cellules CH27-E^p microporées à l'aide de 0,5 µg de pcDNA3.1 GFP et de 2 impulsions de 10 ms à 1300 volts. Le pourcentage de viabilité fut évalué à l'aide d'un marquage au PI. Le pourcentage de transfection fut estimé par l'évaluation du signal de la GFP recueillis en FL1 à l'intérieur de la population de cellules vivantes (FL3 négatives).

Malgré ce faible pourcentage d'efficacité de transfection, observé à l'aide de la construction pcDNA3.1/Zeo GFP (**Figure 29**), la transfection réalisée à l'aide de la construction pcDNA3.1/Zeo Ii EPM nous a permis d'observer une alloréactivité de l'hybridome T 2.102 envers le CMH de classe II I-Ep présent sur le lymphome B CH27-E^p (**Figure 30 F**), signifiant ainsi la capacité de ce type cellulaire à stimuler l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102 malgré ce faible niveau de transfection.

De plus, lors de cette expérimentation, différents clones de la construction pcDNA3.1/Zeo Ii GPR128(526-559) furent testés afin d'évaluer si l'absence de

stimulation induite par la transfection de notre construction pcDNA3.1\Zeo II GPR128(526-559) initiale était due à un problème dans un segment non séquencé, tel que la région promotrice. Ainsi, une activation fut nettement plus visible et d'intensité comparable à celle induite par la transfection de la construction pcDNA3.1 II GPR128(531-545), lorsque les clones B et C de la construction pcDNA3.1\Zeo II GPR128(526-559) furent exprimés chez le lymphome B (**Figure 30 B, C, D**). Quant aux délétions effectuées, de part et d'autre de l'épitope minimal (531-545) sur la construction pcDNA3.1\Zeo II GPR128(526-559) clone A, elles ne permirent toujours pas de restaurer l'alloréactivité observée avec la construction pcDNA3.1\Zeo II GPR128(531-545) (résultats non montrés).

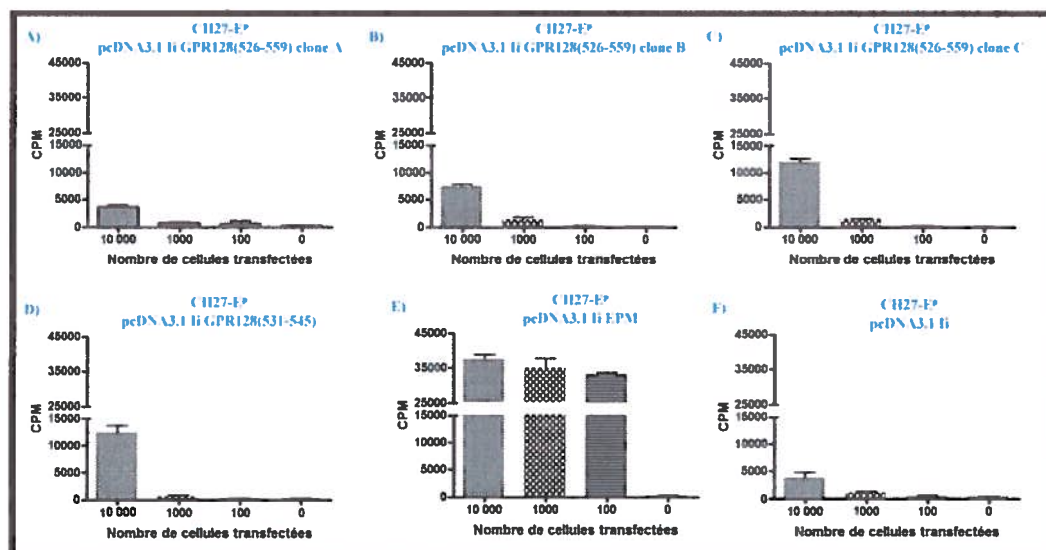


Figure 30: Test d'activation de l'hybridome T 2.102 à l'aide de lymphomes B CH27-E^P transfectés par microporation à l'aide de différentes constructions de GPR128

CH27-E^P microporées à l'aide de 0,5 µg de pcDNA3.1 GFP et de 2 impulsions de 10 ms à 1300 volts.

L'absence de stimulation de l'hybridome T 2.102 par les cellules exprimant les constructions pcDNA3.1\Zeo II GPR128(526-559) clone A, et ses dérivés, semble donc être attribuable à une mutation située à l'extérieur de la région séquencée, telle que la région promotrice.

G. Confirmation des résultats obtenus à l'aide des constructions pcDNA3.1/Zeo II GPR128(526-559) clones B et C par microporation des CHO-E^P.

Les résultats des transfections effectuées sur les CH27-E^P à l'aide des clones B et C de la construction pcDNA3.1/Zeo II GPR128(526-559) ayant tous deux engendrés une hausse de l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102, nous avons donc voulu confirmer ceux-ci dans les cellules CHO-E^P.

Afin de limiter le biais relatif à la méthode de transfection, nous avons élaboré un protocole de microporation des CHO-E^P. Les paramètres relatifs à cette lignée étant distribués par le fabricant, nous avons confirmé ceux-ci à l'aide de notre construction pcDNA3.1/Zeo GFP. Nous avons obtenu une efficacité de transfection de 79% ainsi qu'un pourcentage de viabilité de 58% (**Figure 31**).

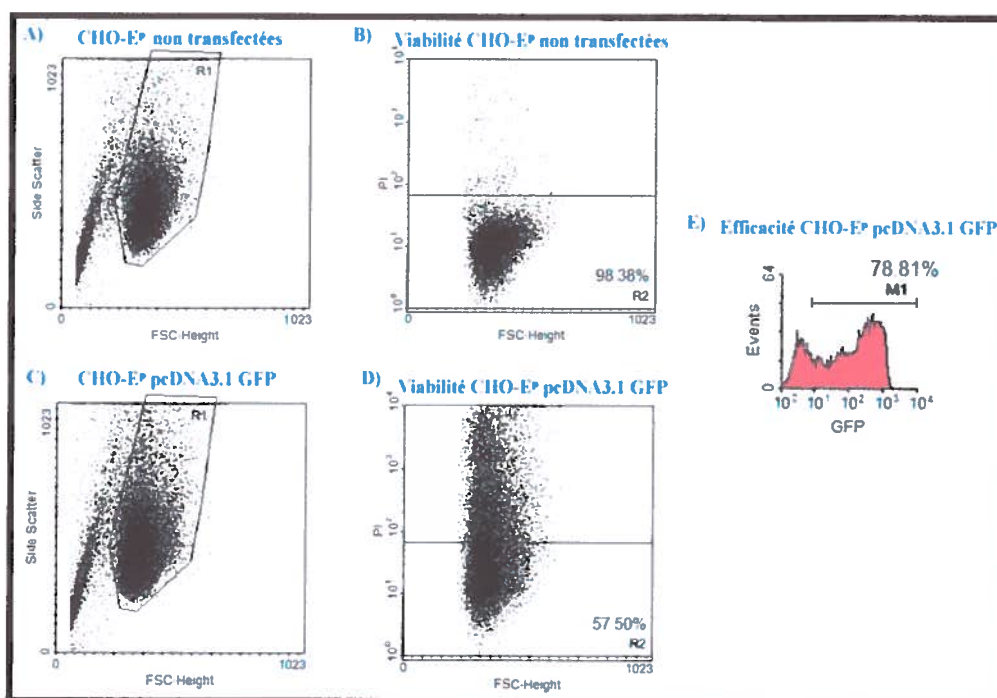


Figure 31: Mise au point de la transfection de la lignée CHO-Ep par microporation

Analyse, en cytométrie en flux, des cellules CHO-E^P microporées à l'aide de 0,5 µg de pcDNA3.1 GFP et de 10 impulsions de 5 ms à 1560 volts. Le pourcentage de viabilité fut évalué à l'aide d'un marquage au PI. Le pourcentage de transfection fut estimé par l'évaluation du signal de la GFP recueillis en FL1 à l'intérieur de la population de cellules vivantes (FL3 négatives).

Suite à la transfection des CHO-E^P à l'aide des clones B et C de pcDNA3.1/Zeo II GPR128(526-559), nous avons observé une activation de l'hybridome T 2.102 (Figure 32 B, C).

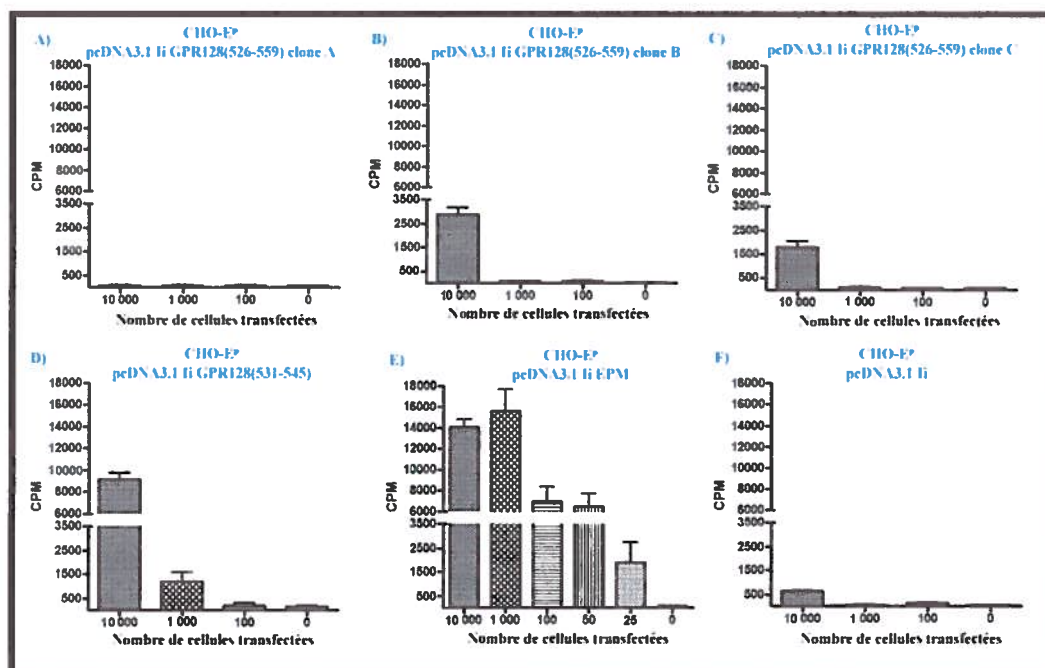


Figure 32 : Activation de l'hybridome T 2.102, stimulé par des CHO-E^P transfectée par microporation et mesurée par la prolifération de la ligné CTLL-2

La reproductibilité de ces résultats semble donc nous confirmer que les cellules sont aptes à apprêter le segment de GPR128(526-559), puis d'effectuer le chargement de l'épitope minimal GPR128(531-545) sur des CMH II I-Ep de façon à pouvoir stimuler l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102.

II. Évaluation de l'expression de GPR128 dans diverses populations impliquées dans l'alloréactivité du clone 2.102 et présentes dans la rate de souris.

Maintenant que nous avons confirmé que la section de GPR128(526-559) était apte à être apprêtée, chargée sur un CMH II I-E^P et à stimuler l'alloréactivité de l'hybridome T 2.102, nous avons à déterminer de quelle façon cette protéine pouvait être amenée à être présentée par des CPA. S'agit-il d'une protéine fortement exprimée dans les CPA ou est-elle exprimée dans d'autres types cellulaires puis recyclée par des CPA. Bien que l'expression de GPR128 a été identifiée dans plusieurs tissus tels que la rate, le colon et les testicules, les cellules l'exprimant n'ont pour le moment pas été identifiées de façon spécifique. Nous ne pouvons donc pas connaître pour le moment si les cellules stimulant l'alloréactivité du clone T 2.102 expriment GPR128.

Afin de déterminer dans quelle proportion GPR128 est exprimé par les cellules immunitaires de rates de souris, nous avons procédé à une évaluation de l'expression par PCR en temps réel dans les populations CD11c, CD11b, CD19 et CD4+/CD8+. Le marqueur CD11c fut utilisé ici afin d'isoler la population de DC alors que le marqueur CD11b fut utilisé pour isoler les populations de granulocytes, monocytes et NK. Quant au marqueur CD19, il fut utilisé afin d'isoler la population de cellules B de la rate, alors que l'utilisation de la combinaison des marqueurs CD4 et CD8 fut utilisée afin d'enrichir les populations de cellules T.

Ainsi, lorsque les résultats obtenus sont comparés à l'expression totale retrouvée dans la rate, nous observons que l'expression du gène dans ces populations est très faible (**Figure 33**). Cela favorise donc l'hypothèse selon laquelle GPR128 est principalement exprimé dans des cellules autres qu'hématopoïétiques, suggérant ainsi que sa présentation par des CPA s'effectue davantage par un mécanisme indirect que par la présentation de matériel intracellulaire.

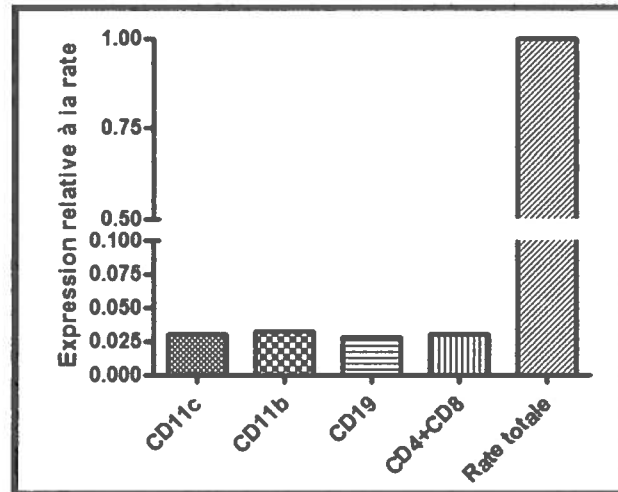


Figure 33: Expression relative de GPR128 dans diverses populations issues de rate de souris B6.AKR

DISCUSSION

Depuis la publication des travaux de Medawar (Gibson et Medawar 1943; Medawar 1944; Billingham, Krohn, et Medawar 1951; Billingham, Brent, et Medawar 1953), l'immunologie de la transplantation connut de nombreux développements. Cependant la spécificité du TCR et l'implication des peptides dans l'alloreconnaissance restent encore inconnues. De plus, la cause de la haute fréquence des précurseurs alloréactifs observée reste encore sujette à délibération. L'hypothèse des multiples complexes binaires de Matzinger affronta longtemps celle de Bevan, reposant sur la haute densité des déterminants (Matzinger et Bevan 1977; Bevan 1984). Toutefois à la lueur des derniers travaux, ces deux hypothèses semblent avoir été remplacées par le concept du TCR polyspécifique (Cai et Hafler 2007; Wucherpfennig et al. 2007).

Le TCR 2C fut le premier modèle où ces complexes allogénique et syngénique furent résolus par cristallographie (Garcia et al. 1998; Colf et al. 2007). Ce modèle nous a permis d'observer et de comprendre bon nombre des caractéristiques des interactions TCR-pCMH telles que : l'orientation diagonale du TCR au-dessus de la niche peptidique (Garcia, Teyton, et Wilson 1999), la flexibilité du TCR et sa capacité à répondre à différents pCMH (Hornell et al. 2001). De plus, bien que les travaux portant sur l'alloreconnaissance du complexe H-2K^{bm3}/dEV8 suggéraient un mécanisme se rapprochant d'un mimétisme moléculaire (Garcia, Teyton, et Wilson 1999), Colf et collaborateurs démontrèrent en 2007 que le TCR 2C pouvait reconnaître un complexe pCMH allogénique en absence de mimétisme moléculaire (Colf et al. 2007) et se rapproche donc davantage d'une polyspécificité.

Bien que le modèle du TCR 2C permit de nombreuses observations décrivant le fonctionnement des interactions TCR-pCMH (allogénique et syngénique), celui-ci décrit une situation non représentative d'un point de vue physiologique. Ce modèle étant élaboré autour d'un clone de cellule T qui fut sélectionné, en premier lieu, en fonction de sa très haute affinité pour un complexe pCMH allogénique (H-2L^d), ce dernier fausse l'interprétation des interactions alloréactives. Le modèle du TCR 2C est donc plus représentatif d'un contexte physiologique d'un individu déjà immunisé contre ce complexe pCMH allogénique et où une sélection clonale a déjà poli l'affinité des TCR de cette population mémoire. Afin d'obtenir des observations plus représentatives d'un point de vue physiologique, un modèle de TCR basé sur un clone

de cellule T sélectionné, avant tout, en fonction de sa reconnaissance syngénique est nécessaire. Ainsi, le modèle du TCR 2.102 tente de répondre à ce besoin.

Le clone de cellule T exprimant le TCR 2.102 fut isolé, dans un premier temps, en fonction de sa reconnaissance dans un contexte syngénique ($I-E^k$) de l'épitope Hb(64-76) (Lorenz et Allen 1988, 1989; Evavold et al. 1992). Puis, son allorecognition contre $I-E^p$ fut observée dans un second temps (Daniel, Grakoui, et Allen 1998), faisant donc de lui un candidat idéal afin d'étudier les interactions TCR-pCMH allogénique et syngénique dans un contexte plus physiologique. Des travaux ont déjà démontré le caractère peptide-dépendant de cette reconnaissance du complexe pCMH allogénique $I-E^p$ par le TCR 2.102 (Daniel, Horvath, et Allen 1998), cependant l'identité de l'allopeptide impliqué reste encore inconnue.

Plusieurs approches sont possibles afin d'identifier les peptides impliqués dans des interactions TCR-pCMH, toutefois cet exercice s'avère souvent problématique en raison du nombre élevé de peptides présentés par les cellules (Archbold, Ely et al. 2008). Ainsi, bien qu'un peptide synthétique (EPM) ait été élaboré afin de mimer l'épitope naturel impliqué dans l'alloréactivité du TCR 2.102, aucun peptide isolé à partir de complexes $I-E^p$ élués ne permit l'induction de l'alloréactivité du TCR 2.102 (Felix et al. 2006). Cependant, une approche utilisant la bioinformatique, conjuguée aux connaissances actuelles du motif de liaison peptidique à $I-E^p$ ainsi qu'à la séquence de EPM, permet d'identifier des candidats potentiels et exprimés chez la souris : les épitopes GPR128(531-545) et ARN PAF53(38-52) (Felix et al. 2006).

Felix et collaborateurs ont ainsi publié en 2006 des résultats démontrant le potentiel de l'épitope GPR128(531-545) à stimuler l'alloréactivité du clone de cellules T 2.102 lorsque cet épitope est chargé sur des CPA exprimant $I-E^p$ (Felix et al. 2006). Ainsi le but du présent projet fut de cloner la protéine GPR128 dans son intégralité afin d'évaluer si cet épitope pouvait être généré naturellement lorsque cette protéine est introduite dans la voie d'apprêtement cellulaire.

Les fibroblastes CHO- E^p n'étant pas aptes à stimuler une réaction d'alloréactivité lorsqu'ils sont en présence du clone de cellules T 2.102 alors que les lymphomes B CH27- E^p le sont, il a été suggéré que les CHO- E^p ne présentent pas naturellement le complexe allopeptide/ $I-E^p$ nécessaire à la stimulation du clone T 2.102 (Daniel, Grakoui, et Allen 1998; Daniel, Horvath, et Allen 1998). Nous avons donc voulu exprimer la protéine GPR128 dans des CHO- E^p afin d'évaluer si son expression dans ces cellules pouvait permettre de reconstituer l'alloréactivité du clone

T 2.102 contre I-E^P. Toutefois, l'analyse de l'expression de GPR128 dans ces deux lignées cellulaires (CHO-E^P et CH27-E^P), nous a permis de constater l'absence d'ARNm correspondant à GPR128 dans le lymphome B CH27-E^P (résultat non montré). Ainsi, nous pouvons présager qu'il y a d'autres allopeptides naturels impliqués dans l'allorecognition du TCR 2.102 face au CMH II I-E^P.

I. Amplification de GPR128 dans son intégralité

En premier lieu, plusieurs tentatives de cloner la région codante de la protéine GPR128 (nm_172825) dans son intégralité furent effectuées (**Figure 34**). Bien que différentes paires d'amorces furent utilisées afin d'amplifier la région codante, l'obtention de celle-ci fut problématique. Malgré de nombreuses tentatives d'optimisation, l'obtention de la séquence codant pour GPR128 dans son intégralité fut impossible à obtenir lors d'une seule réaction.

Cependant, l'amplification de la séquence codante en trois segments chevauchants fut possible. Ainsi, afin de permettre une amplification intégrale des 2355 pb constituant la séquence du cadre de lecture codant GPR128, l'approche d'amplification par chevauchement (*overlap extension* ou *SOE*) fut tentée. Initialement conçue pour effectuer de la mutagenèse dirigée (Higuchi, Krummel, et Saiki 1988; Ho et al. 1989), cette technique fut appliquée par la suite à la création de protéines chimériques en absence de site de restriction (Horton et al. 1989; Wurch, Lestienne, et Pauwels 1998). L'emploi de cette approche afin d'amplifier la totalité de la séquence codante n'engendra toutefois pas de résultats probants. Tel que mentionné dans des travaux antérieurs, l'efficacité de la phase d'appariement peut fortement influencer sur le rendement de la réaction d'amplification et pourrait expliquer les résultats ici obtenus (Villarreal et Long 1991). L'efficacité de cette phase d'appariement étant dépendante de conditions physiques et de la nature de la séquence chevauchante (Villarreal et Long 1991), ainsi la présence de structures secondaires situées au niveau des sites de chevauchements pourraient être la raison de ces difficultés ou celles-ci pourraient être simplement imputables à une erreur d'hybridation des amorces.

La présence des produits de PCR de longueurs inférieures à celles attendues, tels que ceux obtenus lors des essais d'amplification par chevauchement, est un problème souvent rencontré lors de l'amplification de gènes issus de génome

complexe et est souvent imputable à une erreur d'hybridation des amorces (Don et al. 1991). Toutefois, la longueur des sections chevauchantes ici impliquées étant particulièrement élevées (respectivement 239pb et 233pb), la spécificité de ces sections aurait dû être très élevée. Nous avons tenté tout de même une amplification à l'aide de la technique de PCR par essais (*touchdown pcr*) afin d'optimiser l'appariement lors de la réaction d'amplification (Don et al. 1991). Cette technique ne permet cependant pas l'obtention de la séquence codante intégrale de GPR128 et reproduisit le même patron d'amplification erronée, nous indiquant que la source de ces erreurs d'amplifications devait être autre qu'un mauvais appariement des sections chevauchantes.

Une analyse de la distribution des domaines transmembranaires de GPR128 (**Figure 35**) nous montre que l'ensemble de ces domaines se situe approximativement entre les positions 430 et 720 de la protéine et est donc codé par la séquence située entre la position 1290 et 2160 du cadre de lecture de GPR128. Alors, afin d'expliquer les difficultés à obtenir l'amplification de la section 3' de GPR128 (exon 7 à l'extrémité 3') ainsi que les problèmes qui sont survenus lors des tentatives d'amplifications par chevauchements, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une interaction des séquences codant des domaines transmembranaires pourrait avoir lieu lors des réactions d'amplifications et nuire à celle-ci.

Ainsi, afin de contourner cette difficulté d'amplification de la région codante pour les passages transmembranaires, un clonage successif des trois fragments préalablement amplifiés fut réalisé dans un vecteur pBluescript II SK-. Toutefois, lors du séquençage de l'assemblage obtenu, deux mutations ont été retrouvées et ce dans la totalité des clones séquencés. La première était une transition ponctuelle à la position 1080 de la séquence nm_172825 où une thymidine fut substituée par une cystéine, ayant comme impact la permutation d'une phénylalanine pour une leucine. Cette dernière s'est toutefois avérée être une erreur dans la séquence publiée nm_172825 confirmée par l'alignement entre les séquences publiées nm_172825 et la séquence génomique NT_039624.7 (**Figure 36**). La seconde mutation se situait à la position 1222 de la séquence nm_172825 et consistait en une insertion d'une adénine à l'intérieur d'une séquence de 6 adénines consécutives induisant alors un décalage du cadre de lecture en amont de la séquence codant pour l'épitope putatif.

L'amplification et le séquençage du segment d'ADN génomique des souris utilisées dans ces travaux (sur fond C57BL/6) nous a permis d'établir que la source de

ces décalages du cadre de lecture provenait de la transcriptase inverse utilisée afin d'obtenir l'ADNc de GPR128, car l'alignement des séquences obtenues avec la séquence nm_172825 correspondait et que l'insertion à la position 1222 était absente. Cette insertion peut donc être attribuable seulement au glissement de la transcriptase inverse employée pour la génération de l'ADNc utilisé pour le clonage de GPR128.

Proposé par Streisinger et collaborateur en 1966, le décalage du cadre de lecture par glissement de la polymérase est un phénomène par lequel certaines bases sont insérées ou éliminées lors de la réplication de l'ADN (Streisinger et al. 1966). Le glissement de la polymérase est fortement lié à la présence de séquences répétées en tandem appelées microsatellites (Streisinger et al. 1966). Ces séquences sont composées de répétitions de patrons contenant 1-6 pb et selon le nombre de cycles, ces séquences peuvent atteindre des longueurs totales d'environ 100pb (Nadir et al. 1996). Plusieurs propriétés des microsatellites peuvent affecter leurs taux de mutation, notamment la longueur du patron de répétition (mononucléotides versus di- ou trinucleotides), le nombre de répétitions du patron, la présence d'interruption dans la répétition ainsi que la composition des séquences ceinturant la répétition (Boyer et al. 2002). Lors du glissement de la polymérase, cette dernière arrête la polymérisation lorsqu'elle se trouve dans une séquence répétée et se dissocie du brin nouvellement synthétisé (Viguera, Canceill, et Ehrlich 2001). Ce nouveau brin se sépare alors du brin matrice et se réaligne avec une autre répétition afin de poursuivre la polymérisation et générère ainsi une insertion ou une délétion (Viguera, Canceill, et Ehrlich 2001).

Après l'analyse de la séquence publiée de GPR128 (nm_172825) à l'aide du logiciel Microsatellite Repeats Finder distribué par BioPHP (<http://www.biophp.org/>) plusieurs séquences répétées ont été repérées (**Tableau 7**). Ainsi, la séquence composée de 6 adénines consécutives située à la position 1215 représente l'un de ces microsatellites. De plus, un autre microsatellite composé de la séquence répétée AACAACAAC fut retrouvé quelques 33 pb plus loin (**Tableau 7**). La présence de ces deux microsatellites rapprochés a peut-être contribué de façon importante au glissement de la polymérase et de l'insertion de l'adénine à la position 1222. De plus, le nombre d'adénines consécutives, bien que peu élevé dans le cas présent, semble être adéquat pour induire ce glissement. En effet, il a été démontré que la présence de 7 adénines consécutives était suffisante pour augmenter le taux de mutation de l'ordre de 1550 fois dans un modèle de levures, dans lequel la machinerie de réparation post-

réplication fut inhibée par la mutation du gène *msh2* (Tran et al. 1997). De plus, de façon plus spécifique, des travaux portant sur la transcriptase inverse du virus de la leucémie bovine (BLV) ont démontré que des successions de 3 à 5 nucléotides successifs étaient des endroits propices aux mutations engendrant un décalage de cadre de lecture (Mansky et Temin 1994). Il reste cependant inexpliqué que dans notre cas aucune délétion ne fut observée. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le contexte entourant la séquence favorisait un réaligement ne permettant qu'une insertion.

Nous devons donc corriger cette construction par mutagenèse dirigée car la transcriptase inverse utilisée semble invariablement introduire une adénine à la position 1222. Cependant, afin de simplifier la correction, l'utilisation d'une transcriptase inverse fonctionnant à haute température pourrait constituer une alternative plus aisée que la mutagenèse dirigée. L'utilisation de transcriptases inverses thermostables telle que la *Tth DNA polymerase*, permet de synthétiser de l'ADNc à une température élevée, diminuant de ce fait les difficultés rencontrées en présence de structures secondaires (Ruttimann et al. 1985; Myers et Gelfand 1991; Yamada et al. 1998; Zhang, Pan, et Gao 2001; Smith et al. 2006).

II. Utilisation d'un modèle d'expression en fusion avec la chaîne invariante (Ii)

Devant les difficultés rencontrées lors du clonage de GPR128, nous avons poursuivi le projet par l'évaluation de la capacité des CHO, exprimant I-E^p, à apprêter une portion de GPR128. Félix et collaborateur ayant déjà identifié les résidus 531 à 545 de GPR128 comme l'épitope putatif (Felix et al. 2006), nous avons cloné la portion de GPR128 comprenant les résidus 526 à 559 dans un vecteur d'expression en fusion avec la chaîne invariante (Ii). Un modèle d'expression d'épitope en fusion avec la chaîne invariante (Ii), ou une forme tronquée de celle-ci, a déjà été utilisé dans des travaux afin d'augmenter le potentiel de présentation de ces épitopes dans un contexte de CMH de classe II (Larocque 2004; Nagaraj et al. 2008; Grujic et al. 2009; Martinez-Gomez et al. 2009). La chaîne invariante ayant pour fonction de stabiliser les complexes CMH II/peptide et de diriger ces derniers en direction de la voie endosomale-lysosomale et plus particulièrement vers les compartiments MHC (Cresswell 1996; Rocha et Neefjes 2008), cette fusion a pour objectif d'augmenter la

proportion d'épitopes se retrouvant dans ces compartiments. Les constructions en fusion avec Ii, élaborées dans le cadre de ce projet, ont toutes été générées à partir de la construction pcDNA3.1 Zeo Ii conçue et caractérisée par le laboratoire du Dr. Claude Daniel (Larocque 2004).

A. Évaluation de la capacité des fibroblastes à apprêter et présenter l'épitope GPR128(526-559)

Lors des premiers tests réalisés sur des fibroblastes CHO-E^P, la construction pcDNA3.1 Zeo Ii GPR128(526-559) clone A fut transfectée à l'aide de lipofectamine™ 2000. Bien que les pourcentages de transfection obtenus furent bien inférieurs à ceux présentés par le fabricant, nous avons jugé ces derniers suffisants afin d'évaluer le potentiel de présentation de notre épitope.

La transfection de fibroblastes CHO-E^P à l'aide de la construction Ii-EPM nous permis de reconstituer l'alloréactivité du TCR 2.102 et par le même fait, a démontré la pertinence du système expérimental utilisé. Toutefois, la transfection des CHO-E^P à l'aide de la construction pcDNA3.1 Ii GPR128(526-559) issue du clone A, n'a pas permis à ces cellules d'induire une réaction d'alloréactivité lorsque présentées aux hybridomes T exprimant le TCR 2.102. La démonstration du potentiel de GPR128(531-545) à induire une réaction d'alloréactivité lorsque présenté dans un contexte I-E^P à des TCR 2.102 a déjà été réalisée (Felix et al. 2006). Nous avons donc postulé, en premier lieu, l'hypothèse selon laquelle la présence de l'une ou l'autre des séquences ceinturant l'épitope minimal entravait l'apprêtement ou la présentation de ce dernier. De plus, l'apprêtement des épitopes étant effectué par une multitude d'intervenants tels que les différentes cathepsines (S, L F, V, B, D, W, AEP) (Zavasnik-Bergant et Turk 2006), le clivage de l'épitope dans la voie endosomale-lysosomale pourrait empêcher la présentation de ce peptide. Ce cas de figure fut notamment illustré par Rodriguez et collaborateurs en 1992 alors qu'ils démontrèrent qu'un épitope d'OVA apprêté par la cathepsine D était supprimé en présence de cathepsine B (Rodriguez et Diment 1992). Cependant, l'activation des hybridomes T 2.102 suite à leurs interactions avec des cellules CHO-E^P, transfectées avec les constructions pcDNA3.1 Ii GPR128(531-545) et son analogue, démontre bien l'absence de site reconnu par des cathepsines, présentes dans la voie endosomale, qui induiraient la destruction de l'épitope putatif. De plus, les délétions effectuées de part

et d'autres de l'épitope minimal ne permirent pas de restaurer l'alloréactivité du TCR 2.102, suggérant alors un problème autre que celui de l'interférence allostérique.

Ainsi, cette absence de stimulation du TCR 2.102 de la part des CHO-E^p transfectées à l'aide de la construction pcDNA3.1 Ii GPR128(526-559) clone A a été imputée à l'existence d'une mutation dans un segment non séquencé de la construction, telle que la région promotrice, empêchant ainsi son expression. La transfection des fibroblastes CHO-E^p à l'aide de constructions pcDNA3.1 Ii GPR128(526-559), issues de deux autres clones séquencés mais non sélectionnés précédemment (clone B et C), nous a permis d'observer une activation de l'hybridome T 2.102, corroborant ainsi l'hypothèse de la présence d'une mutation dans un segment non séquencé du clone sélectionné en premier lieu. Nous avons donc ainsi démontré que les fibroblastes CHO-E^p sont aptes à apprêter et présenter l'épitope GPR128(531-545) lorsque le segment GPR128(526-559) se retrouve dans leurs compartiments MHC.

Il serait toutefois intéressant, pour la suite du projet, de détecter et d'évaluer les différents niveaux d'expressions des constructions en fusion avec Ii suite à leur transfection transitoire. L'ajout d'une étiquette (Tag) aux diverses constructions Ii pourrait permettre de nous assurer de l'expression de la protéine de fusion ainsi que de son uniformité avec les différents contrôles. Cette évaluation pourrait aussi être effectuée à l'aide d'immunobuvardage dirigé contre Ii. Ceci nous permettrait donc de distinguer le niveau d'expression basale d'Ii avec celui des cellules transfectées.

B. Évaluation de la capacité des lymphomes B à apprêter et présenter l'épitope GPR128(526-559)

Des travaux antérieurs ont déjà démontré que les cellules présentatrices non-professionnelles, telles que les fibroblastes, exprimaient la machinerie nécessaire à l'apprêtement et la présentation de peptides dans un contexte de CMH de classe II et étaient aptes à activer des cellules T (Haque et al. 2007). Toutefois, l'expression des cathepsines étant variable selon le type cellulaire, il est probable que les fibroblastes apprêtent les épitopes de façon différente des CPA. Les lymphoblastes B ainsi que les DC expriment l'AEP (asparagine endopeptidase) qui se révèle importante dans l'apprêtement de la chaîne invariante et de plusieurs antigènes (Antoniou et al. 2000; Watts et al. 2005). L'AEP n'étant pas essentielle à l'apprêtement des peptides et de la voie de présentation du CMH de classe II (Maehr et al. 2005; Costantino et al. 2008),

son absence chez les fibroblastes pourrait passer inaperçue quant à la stabilité et la densité des CHM II exprimés à la surface cellulaire mais changer le patron de peptides présentés. La cathepsine G est aussi principalement retrouvée dans les cellules B et les DC humaines et influe de façon importante sur l'apprêtement des antigènes présentés. Elle pourrait donc aussi contribuer à un apprêtement distinct de celui effectué par les fibroblastes (Burster et al. 2004; Burster et al. 2005; Stoeckle et al. 2008). De plus, plusieurs sites (Tyr-Phe) possiblement reconnus par la cathepsine L furent aussi identifiés dans la séquence GPR128(526-559) car cette dernière clive les liaisons peptidiques qui possèdent un acide aminé hydrophobe (Phe, Leu, Val, Trp et Tyr) en P2 et un acide aminé polaire (Tyr, Ser, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn) en P1 (Towatari et Katunuma 1983). La cathepsine L étant fortement impliquée, avec la cathepsine S, dans les processus de présentation antigénique des APC (Nakagawa et al. 1998; Riese et al. 1998; Nakagawa et al. 1999; Shi et al. 1999), cette dernière pourrait modifier la présentation de notre épitope. La cathepsine L étant principalement exprimée chez les fibroblastes dans la voie sécrétoire (Anderson, Stoler, et Scarcello 1989), son impact risque d'être différent chez les lymphocytes B où sa localisation est davantage située au niveau de la voie endosomale (Honey et al. 2001). Enfin, l'expression de HLA-DO chez les lymphocytes B permet de moduler de façon importante le répertoire de peptides présentés et peut donc avoir un impact important quant à la présentation de l'épitope putatif de GPR128.

Nous avons donc répété l'expérimentation en substituant les fibroblastes CHO-E^p par des lymphomes B CH27-E^p. La transfection de cellules B est toutefois particulièrement difficile (Mascarenhas et al. 1998) notamment en raison des aptitudes que possèdent les CPA à dégrader les antigènes et l'ADN comportant des motifs CpG non méthylés détecté par le TLR-9 (Hemmi et al. 2000; Akira et Hemmi 2003; Yoshikawa et al. 2006; Pappalardo et al. 2009). Des travaux antérieurs réalisés sur des cellules REH et NALM-6, deux lignées de précurseurs de cellules B issues de patients leucémiques, ont démontré la piètre efficacité de transfection de plusieurs techniques (Mascarenhas et al. 1998). Alors que l'électroporation engendre une mortalité massive (70%) et une efficacité de transfection négligeable (0.5% à 1%), les agents lipidiques cationiques tels que la Lipofectin[®], Lipofectamine[®] et la Dimric/C n'engendrent pas de meilleurs taux de transfection de ces cellules B (Mascarenhas et al. 1998). Il est à noter qu'un groupe a récemment publié des résultats d'électroporation d'une lignée BJAB affichant un taux de transfection relative de 14.1% et 0,9% en absolu

(Schneider et Kieser 2004). Le Cellfectin® permet toutefois l'obtention d'un taux de transfection se chiffrant à 22% sur les NALM-6 et 11% sur les REH, lors de travaux publiés en 1998 par Mascarenhas et collaborateur (Mascarenhas et al. 1998). Quant aux résultats publiés à l'aide de Superfect™, un agent de transfection composé de polymères, ils ne furent guère plus probants que les techniques présentées précédemment (Mascarenhas et al. 1998).

Nous avons donc entrepris d'évaluer plusieurs autres techniques afin d'identifier celles qui nous permettraient d'obtenir un taux adéquat de transfection du lymphome B CH27-E^p. Plusieurs techniques furent ainsi évaluées : électroporation, PEI, Lipofectamine 2000™, GenCarrier-2™, Geneporter™2, TransIT®-Jurkat (résultats non montrés) ainsi que la microporation. Cependant, seule la microporation permit l'obtention d'un taux de transfection acceptable. Lors des tests préliminaires réalisés sur les CH27-E^p, nous avons obtenu un pourcentage de transfection d'une construction peGFP-N1 de 76% associé à une viabilité de 63%. Cependant, ces paramètres ne purent être appliqués directement à la construction pcDNA3.1GFP sans ajustement, car nous avons constaté que la mise au point devait être réalisée sur chacune des constructions. Ainsi les paramètres initiaux n'ont engendré qu'un faible taux de transfection de 4%, combiné à une viabilité de 79%. Suite aux ajustements effectués, nous avons obtenu un taux de transfection de l'ordre de 45% combiné à une viabilité de 86% (résultats non montrés). Ces résultats sont comparables à ce qui a été obtenu dans la littérature lors de l'emploi de transduction à l'aide de rétrovirus (Mascarenhas et al. 1998), mais surpassent toutes les autres méthodes. Nous avons toutefois évalué si nos méthodes de purification d'ADN et le degré de pureté de nos constructions pcDNA3.1 n'étaient pas la cause de cette baisse d'efficacité de transfection, par rapport à ce qui est obtenu à l'aide de la construction peGFP-N1. Cependant, la transformation de bactéries compétentes à l'aide de la construction peGFP-N1, puis la purification de ce vecteur à l'aide de nos méthodes n'engendrent pas de fluctuations importantes des taux de transfection ou de viabilité obtenus (résultats non montrés). Les fluctuations sont donc fortement attribuables à la nature des constructions transfectées.

Une fois la procédure de transfection du lymphome B CH27-E^p mise au point à l'aide de la construction peGFP-N1, nous avons donc procédé à nos tests d'activation de l'hybridome T 2.102 suite aux transfections de nos différentes constructions pcDNA3.1 Ii. Cependant, seuls les essais engendrant un taux de transfection de 4%

ont pu être réalisés, car le microporateur MP-100 fut changé après la mise au point de la technique à l'aide de nos constructions pcDNA3.1 et aucune transfection efficace du lymphome B n'a pu être obtenue avec le nouvel appareil. Les raisons pour lesquelles le nouvel appareil n'a pu reproduire les résultats obtenus lors de la mise au point ne furent pas identifiées pour le moment. Cependant, une optimisation des paramètres de microporation à l'aide du nouvel appareil est à prévoir afin de réaliser un réplicat de l'expérimentation à l'aide d'un taux de transfection supérieur.

Ce faible pourcentage de transfection fut toutefois suffisant pour induire une réponse importante de la part de notre contrôle positif (pcDNA3.1 Ii-EPM) lors du test d'activation de l'hybridome T 2.102, démontrant ainsi la pertinence de cette approche expérimentale dans les CH27-E^P. De plus, l'activation de l'hybridome T 2.102 obtenue suite à la transfection à l'aide de la construction pcDNA3.1 Ii-GPR128(531-545) nous démontre que la machinerie de présentation des cellules B permet un apprêtement adéquat de l'épitope. En outre, ce résultat suggère une inhibition de la cathepsine L dans les lymphocytes B qui normalement aurait dû détruire l'épitope putatif GPR128(531-545). Cette inhibition de la cathepsine L dans les lymphocytes B a déjà été documentée dans la littérature (Honey et al. 2001). La cathepsine L est très faiblement exprimée dans les lymphocytes B (100 fois moins que dans les macrophages péritonéaux) et est soumise à une régulation étroite par plusieurs mécanismes (Honey et al. 2001). La régulation, dans les lymphocytes B, du niveau de la cathepsine L mature semble être dépendante de la cathepsine S (Honey et al. 2001). De plus, l'absence d'activité de la cathepsine L semble être aussi imputable à la présence d'inhibiteurs spécifiques. Plusieurs auteurs ont identifiés l'isoforme p41 de la chaîne invariante Ii comme une chaperonne permettant de maintenir une régulation de la cathepsine L dans les endosomes tardifs liés à la présentation antigénique ou celle sécrétée dans le milieu extracellulaire (Lennon-Dumenil et al. 2001; Fiebiger et al. 2002; Chiva et al. 2003; Zavasnik-Bergant et al. 2004; Mihelic et al. 2008). Les résultats obtenus lors de nos travaux, toutefois, ne nous permettent pas d'écarter la possibilité de la présence d'un encombrement stérique empêchant l'accès aux sites reconnus par la cathepsine L. Nous pouvons donc conclure que les cathepsines et que la machinerie de présentation en général, exprimée dans le lymphome B CH27-E^P, ne détruisent pas l'épitope putatif de GPR128 et permettent son chargement et sa présentation.

Ainsi, nous pouvons donc conclure que la région 526-559 de GPR128 peut être apprêtée de façon constructive, générant et présentant l'allopeptide putatif GPR128(531-545), et est apte à induire l'alloréactivité du TCR 2.102 contre le CMH de classe II I-E^P. De plus, nous avons démontré que cette capacité peut être aussi bien imputable à des CPA comme les cellules B qu'à des cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles telles que les fibroblastes. Toutefois, l'utilisation d'un fragment de la protéine GPR128 fusionnée à la chaîne invariante Ii insère un important biais en permettant l'expression de l'épitope étudié de façon ciblé dans les MIIC. Ainsi, afin de pouvoir recréer des conditions plus près de la réalité, le clonage de GPR128 dans son intégralité devra être terminé et exprimé dans des cellules afin d'évaluer la capacité de ces dernières à générer l'épitope GPR128(531-545) et à diriger celui-ci vers les compartiments MIIC.

III. Rôle des CPA dans la présentation de l'épitope putatif de GPR128

La capacité des CPA à apprêter de façon constructive l'épitope GPR128(531-545) à partir de l'expression d'un segment de GPR128 étant confirmée, nous avons ensuite déterminé le profil d'expression de GPR128 dans diverses populations de cellules immunitaires présentes dans la rate. La reconnaissance directe étant basée sur l'interaction entre les CPA du donneur et les cellules T alloréactives du receveur, deux hypothèses ont alors été émises lors de ces travaux afin d'expliquer la présentation de GPR128(531-545) dans un contexte de CMH de classe II I-E^P. En premier lieu, l'allopeptide reconnu peut être directement exprimé par la CPA du donneur puis présenté dans un contexte de CMH alloréactif, étrangé au receveur. Lors de ce processus de présentation de peptides endogènes par la voie de CMH de classe II, il a été démontré que le processus d'autophagie contribue fortement à la génération des épitopes présentés (Vyas, Van der Veen, et Ploegh 2008). En second lieu, les CPA, telles que les DC, peuvent présenter des antigènes qui sont dérivés de corps apoptotiques phagocytés (Albert, Sauter, et Bhardwaj 1998; Huang et al. 2000). Cette voie est toutefois souvent associée à l'induction de la tolérance au soi car certains travaux démontrent que la phagocytose de corps apoptotiques induit : l'inhibition de la transcription des cytokines pro-inflammatoires, la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10, IL-13) et la diminution de l'expression des molécules CD40-CD40L (Lleo et al. 2008). Cependant, d'autres travaux démontrent que les DC

peuvent être activées suite à la phagocytose de PBMC en apoptoses et ainsi augmenter l'expression de leurs molécules de co-stimulation telles que CD80, CD83 et CD86 (Johansson et al. 2007). De plus, dans un contexte de transplantation, les CPA du donneur étant activées par le traumatisme chirurgical la phagocytose de corps apoptotiques pourrait ne pas conduire à l'induction de la tolérance mais amorcer une réaction alloréactive.

Ainsi, bien que GPR128 soit fortement exprimé dans la rate, l'expression imputable aux cellules immunitaires contenues dans cet organe ne représente qu'un pourcentage négligeable (<1%) de l'expression totale retrouvée dans la rate. L'expression de GPR128 dans les CPA étant trop faible pour soutenir l'hypothèse de l'implication de l'autophagie dans la présentation de GPR128, la phagocytose de corps apoptotiques semblent donc être l'hypothèse la plus probable permettant d'expliquer la présence de cet épitope dans la voie de présentation des CMH de classe II et sa présentation à la surface cellulaire. L'alloréactivité du clone 2.102 contre le CMH de classe II I-E^p semble donc dépendante ou liée à l'expression de GPR128 dans les tissus environnants.

CONCLUSION

L'objectif du présent projet était d'évaluer le rôle de la protéine GPR128 dans l'alloréactivité du clone de cellule T 2.102 contre le CMH de classe II I-E^P. Des travaux antérieurs ont déjà démontré la capacité du peptide GPR128(531-545) (YFLLVTFTWNGLSAT) à restaurer cette réaction d'alloréactivité lorsque ce dernier est chargé sur des CHO-E^P. Toutefois, la capacité des cellules à apprêter et présenter cet épitope n'est pas connue.

Nous avons donc tenté de cloner et d'exprimer la protéine intégrale (GPR128) dans des CHO-E^P afin d'évaluer si celles-ci pourraient présenter l'allopeptide et restaurer l'alloréactivité du clone de cellule T 2.102. Nous avons toutefois rencontré plusieurs problèmes techniques qui nous ont empêchés de compléter cette approche.

L'utilisation d'un vecteur d'expression en fusion avec la chaîne invariante, élaboré et validé dans le laboratoire du Dr Daniel lors de travaux antérieurs, nous a permis toutefois de démontrer que les fibroblastes et les lymphomes B sont aptes à apprêter et présenter l'épitope putatif de GPR128 lorsque le segment GPR128(526-559) leur est livré dans leurs compartiments endosomaux. Pour y arriver, nous avons réussi à élaborer un protocole de transfection transitoire, utilisant la technologie de la microporation, du lymphome B engendrant un taux de transfection pouvant atteindre 75% et un pourcentage de viabilité supérieur à 62%.

Enfin, alors que l'expression de GPR128 dans les CPA n'était pas documentée, nous avons démontré la faible expression de cette protéine dans différentes populations de cellules immunitaires retrouvées dans la rate. Par la même occasion, nous avons apporté des arguments favorisant l'hypothèse selon laquelle l'alloréactivité du clone 2.102 contre le CMH de classe II I-E^P est dépendante de l'expression de GPR128 dans les tissus environnants.

Afin de confirmer le rôle de l'épitope GPR128(531-545) dans l'alloréactivité du clone T 2.102 certains travaux restent encore à effectuer. Le clonage et l'expression de GPR128 sous sa forme intégrale devra être réalisé dans des fibroblastes ainsi que dans les lymphomes B. De plus, l'utilisation d'ARN d'interférence (ARNi) pourra être utilisé *in vitro* ainsi qu'*in vivo* afin d'évaluer l'impact de l'inhibition de l'expression de GPR128 sur l'incidence des réactions d'alloréactivités du clone T 2.102 contre le CMH de classe II I-E^P.

FIGURES ET TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES

Séquence NM_172825 : Mus musculus G protein-coupled receptor 128

(Gpr128), mRNA.

```

1 ctcttgatct ccctcgggtga agaatgagca tactgcacgc agaaacccac cttctctttg
61 gtgattccaa cttcattact ctgaattaac ttcaaaactc ttaaaccatg agatcacctg
121 tcagacagac cactgaaggg aagaattcct ttcattgttt ataactatct ctgttcgtgc
181 agtggttttg cttcaccatg cgttcctgtc gttcctgcaa tgtccgggta ctggtggcta
241 ttgtgtgtgg gctactgaca ggcatgtgtc tgggactcgg catctggagg atggtcataa
301 ggatcaacag agggatattt gttcctgtgc caagtatccc tgtacagttc tgcaggaatg
361 gcggaaacctg gcaaaaatggc agatgcattt gtacagaaga gtggaaaggg ctgctgtgta
421 caattgctaa tttctgtgaa aatagtaccg acggtgaatt cacccttggc agtatcccag
481 tgggacagata tggaccctct ttgcaaacat gtgaaccggg caccctcaat gcgggcagtc
541 ctaaaagcaac tcggctgtgc aatgtttctg agtttggaaa catagaacta caaaatgtaa
601 ccaaaggaag ttgtaataata aatctacaga ccctggagat acagataaac aaccaaacag
661 caagtgttga gaataattct agagaagccc aggttttaac agcagatgcc agtaaaactga
721 ctgctcagaa tatcacttct gctactacag tgggttgaca gatcttcggg aaagccaaca
781 atgaaagcca ggcaaaaaaa actgctatag ccacagttag tcagattttg gatgccatg
841 aagatgtttt tcaaaaagct gctgagatgg acaacagcaa atccttttag aatcttatca
901 agcaaatgga gaattactcc tattctcaag gtgatcagac agtgggtggaa cccaatatag
961 caatccagtc cgtcactcga gacgacaatt cagggccaaag tgttctcttc tccgtacaga
1021 aaggatctag taattctctg gtttctgtga gaattatgat taacaaaact gcaaatggat
1081 tcaacccaga cggacagacc gaacttcaga tcttacttaa tactggggaa aatagaaaat
1141 catgtgtgtt tatggtgtat caaaaccaca aacttttcca atcaaaaact ttcactgcta
1201 catcagattt tagtcaaaaa attatctcca gcaaaaataa tgaaagtga caacaacgcc
1261 aaaataaagt ttctgtggaa atggtattta atcctacgta tgacaaaaga gaactccggc
1321 ttcactccta tgcttgtgtc tactggaatt ttttaataaa tgactgggac acacaaggct
1381 gccaaaaaac cgggaacacc acagaattcc tccgttgcaa ctgcagccac acgaccaatt
1441 tcgctgtatt gatgagtttc aaaaaggatt acaagtatcc caaatctcta gacatattat
1501 ccaacatcgg ctgtgcctta tccattgctg gtctggctct cacaatctta ttccagattc
1561 tcaccaggaa aatcagaaaa accctcagtaa cctgggtgtt ggtcagtttg tgttcacaa
1621 tgttgatttt taacctcctc ttgtgttttg gaattgaaaa ctccaataag aacctaaaga
1681 caagtgatag tgacatcaat gttaaacctg aaaataacaa aataccagaa agtgacacca
1741 ttgaaacccc gaatccctca tgcacagcca ttgctgcctt gctccactac tttctgctgg
1801 tgacattcac ctggaatgga ctcagtgtca cacaactcta cttccttctg ataagaacca
1861 tgaagcctct ccctcggcat ttcatctatt tcatctcatt agttggatgg ggagtccag
1921 caataatagt aggtgtgacg attgggagta tttatgccct gagtgggaac aagaggatct
1981 gggagttaga ctatcggcaa gaggaaattt gctggctggc cgttcccaag gacaatgatt
2041 atgcaagaag tccacttttg tggtcgttca tcatacctgt aaccattatc ctcatcacca
2101 acattactat atttgtcata atcacagtca aagtgttggt gaagaacaac cagaacctga
2161 caagcacaaa aaaagtttca tccctaaaga aggttttcag cacactatct atcgtgtgtg
2221 tttttggagt tacctggatc ttggcatatg ctatgcta at tagtaacgat gacatcagga
2281 ttgttttcag ctacatatcc tgtcttttca acaccactca gggattgcaa atattcattc
2341 tctacactgt tcgaacaaaa gtatttcaga gtgaagcttc caaaatactg aagtcactgt
2401 catcatcctt tgatagaacg aagccaatgc cttcgataac cccgctgaaa ctgctgtgta
2461 ggatgtacaa tatgctcagg tccctaccat ccctaaatga acgctttagg ctgctggagc
2521 catctggaat gactgaggaa acatcattgt cttgaaagt accaagcaaa atcaagtgcc
2581 taacaagagt taccatgat ggtcttttga ttccaactca taagaattgt atctgtttat
2641 gttattctct aagtgtccta caagatcttc ctgaatgcat gttaaagctg tttattatca
2701 c

```

Figure 34: Séquence codante de GPR128 (nm_172825)

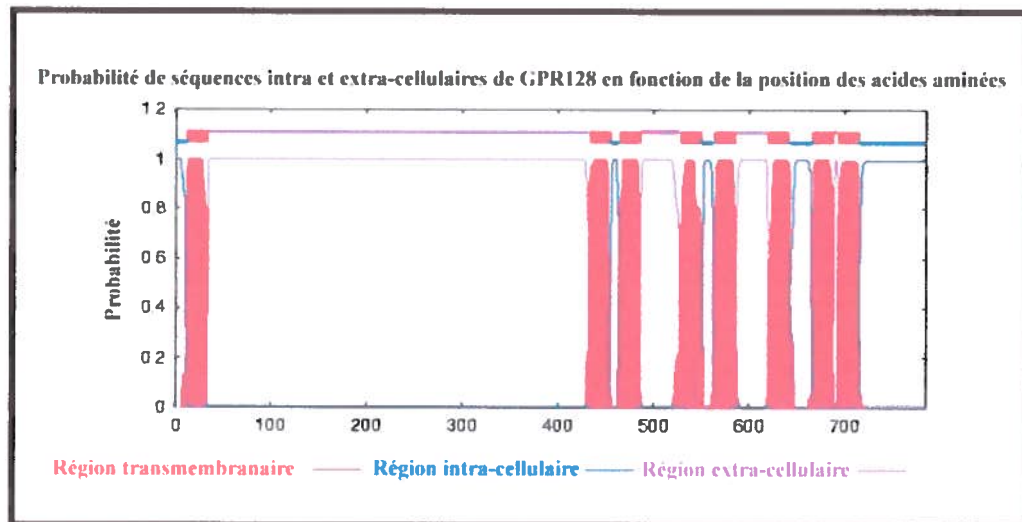


Figure 35: Visualisation de la position des passages transmembranaires de GPR128

Analyse effectuée à l'aide du service web TMHMM Server v. 2.0 disponible sur le site du Center for Biological Sequence analysis (CBS).

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)

Score = 198 bits (107), Expect = 2e-47 Identities = 109/110 (99%), Gaps = 0/110 (0%) Strand=Plus/Minus			
(ARNm: nm_172825)	1022	AGGATCTAGTAATTCTCTGGTTTCTGGTAGAATATTGATTAAACAAAACGCAAATGGATT*	1081
(Génomique: NT_039624.7)	53762062		
		AGGATCTAGTAATTCTCTGGTTTCTGGTAGAATATTGATTAAACAAAACGCAAATGGACT	53762003
(ARNm: nm_172825)	1082	CAACCCAGACGGACAGACCCGAACTTCAGATCTTACTTAATACTGGGGAAA	1131
(Génomique: NT_039624.7)	53762002		
		CAACCCAGACGGACAGACCCGAACTTCAGATCTTACTTAATACTGGGGAAA	53761953

Figure 36: Différences entre les séquences publiées nm_172825 et NT_039624.7

Alignement effectué à l'aide du service BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en date du 20090129 entre la séquence publiée nm_172825 correspondant à la séquence issue de l'ARNm de GPR128 et la séquence NT_039624.7 correspondant à l'ADN génomique du chromosome 16 de la souris C57BL/6J. La position 1080 de la séquence nm_172825 ne correspond pas à celle publié dans la séquence chromosomique.

Tableau 7: Position des répétitions microsatellites contenu dans la séquence nm_172825

<i>Position</i>	<i>Cycle</i>	<i>Répétition</i>	<i>Séquence</i>
241	2	4	TGTGTGTG
793	2	4	AAAAAAAA
1215	2	3	AAAAAA
1248	3	3	AACAACAAC
1348	2	3	TTTTTT
1368	2	3	ACACAC
1383	2	3	AAAAAA
2167	2	3	AAAAAA

L'analyse de la séquence c'est effectué avec la version démonstrateur du logiciel Microsatellite Repeats Finder distribué par BioPHP (<http://www.biophp.org/>). Un cycle correspond au nombre de nucléotides qui sont répétés et l'intitulé Répétition correspond au nombre de fois que le cycle est répété de façon successive.

BIBLIOGRAPHIE

- Aifantis, I., J. Buer, H. von Boehmer, and O. Azogui. 1997. Essential Role of the Pre-T Cell Receptor in Allelic Exclusion of the T Cell Receptor Beta Locus. *Immunity* 7 (5):601-7.
- Akira, S., and H. Hemmi. 2003. Recognition of Pathogen-Associated Molecular Patterns by Tlr Family. *Immunol Lett* 85 (2):85-95.
- Albert, M. L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. Dendritic Cells Acquire Antigen from Apoptotic Cells and Induce Class I-Restricted Ctls. *Nature* 392 (6671):86-9.
- Alexander-Miller, M. A., K. Burke, U. H. Koszinowski, T. H. Hansen, and J. M. Connolly. 1993. Alloreactive Cytotoxic T Lymphocytes Generated in the Presence of Viral-Derived Peptides Show Exquisite Peptide and Mhc Specificity. *J Immunol* 151 (1):1-10.
- Allard, Véronique. 2005. *Génération De Cellules T Régulatrices Artificielles, Mémoire De Maîtrise (Université Du Québec. Institut National De La Recherche Scientifique)*. Sainte-Foy: Université du Québec Institut national de la recherche scientifique.
- Anderson, G. R., D. L. Stoler, and L. A. Scarcello. 1989. Normal Fibroblasts Responding to Anoxia Exhibit Features of the Malignant Phenotype. *J Biol Chem* 264 (25):14885-92.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an Immunological Self Shadow within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 298 (5597):1395-401.
- Antoniou, A. N., S. L. Blackwood, D. Mazzeo, and C. Watts. 2000. Control of Antigen Presentation by a Single Protease Cleavage Site. *Immunity* 12 (4):391-8.
- Archbold, J. K., L. K. Ely, L. Kjer-Nielsen, S. R. Burrows, J. Rossjohn, J. McCluskey, and W. A. Macdonald. 2008. T Cell Allorecognition and Mhc Restriction--a Case of Jekyll and Hyde? *Mol Immunol* 45 (3):583-98.
- Archbold, J. K., W. A. Macdonald, S. R. Burrows, J. Rossjohn, and J. McCluskey. 2008. T-Cell Allorecognition: A Case of Mistaken Identity or Deja Vu? *Trends Immunol* 29 (5):220-6.
- Basu, D., C. B. Williams, and P. M. Allen. 1998. In Vivo Antagonism of a T Cell Response by an Endogenously Expressed Ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (24):14332-6.
- Bennett, K., T. Levine, J. S. Ellis, R. J. Peanasky, I. M. Samloff, J. Kay, and B. M. Chain. 1992. Antigen Processing for Presentation by Class Ii Major Histocompatibility Complex Requires Cleavage by Cathepsin E. *Eur J Immunol* 22 (6):1519-24.
- Bevan, J.M. 1984. High Determinant Density May Explain the Phenomenon of Alloreactivity. *Immunology Today* 5 (5):128-130.
- Bevan, M. J. 1997. In Thymic Selection, Peptide Diversity Gives and Takes Away. *Immunity* 7 (2):175-8.
- Bharat, A., and T. Mohanakumar. 2007. Allopeptides and the Alloimmune Response. *Cell Immunol* 248 (1):31-43.
- Bhardwaj, V., V. Kumar, H. M. Geysen, and E. E. Sercarz. 1993. Degenerate Recognition of a Dissimilar Antigenic Peptide by Myelin Basic Protein-Reactive T Cells.

- Implications for Thymic Education and Autoimmunity. *J Immunol* 151 (9):5000-10.
- Billingham, R. E., L. Brent, and P. B. Medawar. 1953. Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. *Nature* 172 (4379):603-6.
- Billingham, R. E., P. L. Krohn, and P. B. Medawar. 1951. Effect of Cortisone on Survival of Skin Homografts in Rabbits. *Br Med J* 1 (4716):1157-63.
- Birmingham, C. L., A. C. Smith, M. A. Bakowski, T. Yoshimori, and J. H. Brumell. 2006. Autophagy Controls Salmonella Infection in Response to Damage to the Salmonella-Containing Vacuole. *J Biol Chem* 281 (16):11374-83.
- Bjarnadottir, T. K., R. Fredriksson, P. J. Hoglund, D. E. Gloriam, M. C. Lagerstrom, and H. B. Schioth. 2004. The Human and Mouse Repertoire of the Adhesion Family of G-Protein-Coupled Receptors. *Genomics* 84 (1):23-33.
- Bjarnadottir, T. K., R. Fredriksson, and H. B. Schioth. 2007. The Adhesion Gpcrs: A Unique Family of G Protein-Coupled Receptors with Important Roles in Both Central and Peripheral Tissues. *Cell Mol Life Sci* 64 (16):2104-19.
- Boniface, J. J., Z. Reich, D. S. Lyons, and M. M. Davis. 1999. Thermodynamics of T Cell Receptor Binding to Peptide-Mhc: Evidence for a General Mechanism of Molecular Scanning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (20):11446-51.
- Born, W. K., N. Jin, M. K. Aydintug, J. M. Wands, J. D. French, C. L. Roark, and R. L. O'Brien. 2007. Gammadelta T Lymphocytes-Selectable Cells within the Innate System? *J Clin Immunol* 27 (2):133-44.
- Boyer, J. C., N. A. Yamada, C. N. Roques, S. B. Hatch, K. Riess, and R. A. Farber. 2002. Sequence Dependent Instability of Mononucleotide Microsatellites in Cultured Mismatch Repair Proficient and Deficient Mammalian Cells. *Hum Mol Genet* 11 (6):707-13.
- Burster, T., A. Beck, E. Tolosa, V. Marin-Esteban, O. Rotzschke, K. Falk, A. Lautwein, M. Reich, J. Brandenburg, G. Schwarz, H. Wiendl, A. Melms, R. Lehmann, S. Stevanovic, H. Kalbacher, and C. Driessen. 2004. Cathepsin G, and Not the Asparagine-Specific Endoprotease, Controls the Processing of Myelin Basic Protein in Lysosomes from Human B Lymphocytes. *J Immunol* 172 (9):5495-503.
- Burster, T., A. Beck, E. Tolosa, P. Schnorrer, R. Weissert, M. Reich, M. Kraus, H. Kalbacher, H. U. Haring, E. Weber, H. Overkleeft, and C. Driessen. 2005. Differential Processing of Autoantigens in Lysosomes from Human Monocyte-Derived and Peripheral Blood Dendritic Cells. *J Immunol* 175 (9):5940-9.
- Busch, R., I. Cloutier, R. P. Sekaly, and G. J. Hammerling. 1996. Invariant Chain Protects Class II Histocompatibility Antigens from Binding Intact Polypeptides in the Endoplasmic Reticulum. *EMBO J* 15 (2):418-28.
- Buslepp, J., H. Wang, W. E. Biddison, E. Appella, and E. J. Collins. 2003. A Correlation between Tcr Valpha Docking on Mhc and Cd8 Dependence: Implications for T Cell Selection. *Immunity* 19 (4):595-606.
- Cai, G., and D. A. Hafler. 2007. Multispecific Responses by T Cells Expanded by Endogenous Self-Peptide/Mhc Complexes. *Eur J Immunol* 37 (3):602-12.
- Call, M. E., J. Pyrdol, M. Wiedmann, and K. W. Wucherpfennig. 2002. The Organizing Principle in the Formation of the T Cell Receptor-Cd3 Complex. *Cell* 111 (7):967-79.

- Call, M. E., and K. W. Wucherpfennig. 2005. The T Cell Receptor: Critical Role of the Membrane Environment in Receptor Assembly and Function. *Annu Rev Immunol* 23:101-25.
- Carrel, A. 1902. The Operative Technique for Vascular Anastomoses and Transplantation of Viscera. *Lyon Med.* 98:859.
- Carrel A: *Nobel Lectures in Physiology or Medicine 1901 - 1921.*
- Carrel, Alexis. 1909. Doppelte Nephrektomie Und Reimplantation Einer Niere. *Arch Klin Chirurg* 88:379-411.
- Carven, G. J., S. Chitta, I. Hilgert, M. M. Rushe, R. F. Baggio, M. Palmer, J. E. Arenas, J. L. Strominger, V. Horejsi, L. Santambrogio, and L. J. Stern. 2004. Monoclonal Antibodies Specific for the Empty Conformation of Hla-Dr1 Reveal Aspects of the Conformational Change Associated with Peptide Binding. *J Biol Chem* 279 (16):16561-70.
- Casetti, R., and A. Martino. 2008. The Plasticity of Gamma Delta T Cells: Innate Immunity, Antigen Presentation and New Immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 5 (3):161-70.
- Chalermkulrat, W., I. P. Neuringer, W. J. Brickey, N. J. Felix, S. H. Randell, J. P. Ting, and R. M. Aris. 2003. Hierarchical Contributions of Allorecognition Pathways in Chronic Lung Rejection. *Am J Respir Crit Care Med* 167 (7):999-1007.
- Chang, S. C., F. Momburg, N. Bhutani, and A. L. Goldberg. 2005. The Er Aminopeptidase, Erap1, Trims Precursors to Lengths of Mhc Class I Peptides by A "Molecular Ruler" Mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (47):17107-12.
- Chapman, H. A. 2006. Endosomal Proteases in Antigen Presentation. *Curr Opin Immunol* 18 (1):78-84.
- Chen, J., H. N. Eisen, and D. M. Kranz. 2003. A Model T-Cell Receptor System for Studying Memory T-Cell Development. *Microbes Infect* 5 (3):233-40.
- Chen, J. L., G. Stewart-Jones, G. Bossi, N. M. Lissin, L. Wooldridge, E. M. Choi, G. Held, P. R. Dunbar, R. M. Esnouf, M. Sami, J. M. Boulter, P. Rizkallah, C. Renner, A. Sewell, P. A. van der Merwe, B. K. Jakobsen, G. Griffiths, E. Y. Jones, and V. Cerundolo. 2005. Structural and Kinetic Basis for Heightened Immunogenicity of T Cell Vaccines. *J Exp Med* 201 (8):1243-55.
- Chen, Y., Y. Demir, A. Valujskikh, and P. S. Heeger. 2003. The Male Minor Transplantation Antigen Preferentially Activates Recipient Cd4+ T Cells through the Indirect Presentation Pathway in Vivo. *J Immunol* 171 (12):6510-8.
- Chen, Z. W., and N. L. Letvin. 2003. Vgamma2vdelta2+ T Cells and Anti-Microbial Immune Responses. *Microbes Infect* 5 (6):491-8.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, W. S. Lane, J. C. Gorga, L. J. Stern, D. A. Vignali, and J. L. Strominger. 1992. Predominant Naturally Processed Peptides Bound to Hla-Dr1 Are Derived from Mhc-Related Molecules and Are Heterogeneous in Size. *Nature* 358 (6389):764-8.
- Chiva, C., P. Barthe, A. Codina, M. Gairi, F. Molina, C. Granier, M. Pugniere, T. Inui, H. Nishio, Y. Nishiuchi, T. Kimura, S. Sakakibara, F. Albericio, and E. Giralt. 2003. Synthesis and Nmr Structure of P41icf, a Potent Inhibitor of Human Cathepsin L. *J Am Chem Soc* 125 (6):1508-17.
- Claas, F. H., D. L. Roelen, A. Mulder, Doxiadis, II, M. Oudshoorn, and M. Heemskerk. 2006. Differential Immunogenicity of Hla Class I Alloantigens for the Humoral

- Versus the Cellular Immune Response: "Towards Tailor-Made Hla Mismatching". *Hum Immunol* 67 (6):424-9.
- Claverie, J. M., A. Prochnicka-Chalufour, and L. Bougueleret. 1989. Implications of a Fab-Like Structure for the T-Cell Receptor. *Immunol Today* 10 (1):10-4.
- Colf, L. A., A. J. Bankovich, N. A. Hanick, N. A. Bowerman, L. L. Jones, D. M. Kranz, and K. C. Garcia. 2007. How a Single T Cell Receptor Recognizes Both Self and Foreign Mhc. *Cell* 129 (1):135-46.
- Costantino, C. M., H. C. Hang, S. C. Kent, D. A. Hafler, and H. L. Ploegh. 2008. Lysosomal Cysteine and Aspartic Proteases Are Heterogeneously Expressed and Act Redundantly to Initiate Human Invariant Chain Degradation. *J Immunol* 180 (5):2876-85.
- Cresswell, P. 1996. Invariant Chain Structure and Mhc Class Ii Function. *Cell* 84 (4):505-7.
- Crumpacker, D. B., J. Alexander, P. Cresswell, and V. H. Engelhard. 1992. Role of Endogenous Peptides in Murine Allogenic Cytotoxic T Cell Responses Assessed Using Transfectants of the Antigen-Processing Mutant 174xcem.T2. *J Immunol* 148 (10):3004-11.
- Dai, S., E. S. Huseby, K. Rubtsova, J. Scott-Browne, F. Crawford, W. A. Macdonald, P. Marrack, and J. W. Kappler. 2008. Crossreactive T Cells Spotlight the Germline Rules for Alphabeta T Cell-Receptor Interactions with Mhc Molecules. *Immunity* 28 (3):324-34.
- Daniel, C., A. Grakoui, and P. M. Allen. 1998. Inhibition of an in Vitro Cd4+ T Cell Alloresponse Using Altered Peptide Ligands. *J Immunol* 160 (7):3244-50.
- Daniel, C., S. Horvath, and P. M. Allen. 1998. A Basis for Alloreactivity: Mhc Helical Residues Broaden Peptide Recognition by the Tcr. *Immunity* 8 (5):543-52.
- Davis, M. M., and P. J. Bjorkman. 1988. T-Cell Antigen Receptor Genes and T-Cell Recognition. *Nature* 334 (6181):395-402.
- De Paoli, P., D. Gennari, P. Martelli, G. Basaglia, M. Crovatto, S. Battistin, and G. Santini. 1991. A Subset of Gamma Delta Lymphocytes Is Increased During Hiv-1 Infection. *Clin Exp Immunol* 83 (2):187-91.
- Degano, M., K. C. Garcia, V. Apostolopoulos, M. G. Rudolph, L. Teyton, and I. A. Wilson. 2000. A Functional Hot Spot for Antigen Recognition in a Superagonist Tcr/Mhc Complex. *Immunity* 12 (3):251-61.
- Delgado, M. A., R. A. Elmaoued, A. S. Davis, G. Kyei, and V. Deretic. 2008. Toll-Like Receptors Control Autophagy. *EMBO J* 27 (7):1110-21.
- Demotz, S., A. Sette, K. Sakaguchi, R. Buchner, E. Appella, and H. M. Grey. 1991. Self Peptide Requirement for Class Ii Major Histocompatibility Complex Allorecognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (19):8730-4.
- Dengjel, J., O. Schoor, R. Fischer, M. Reich, M. Kraus, M. Muller, K. Kreymborg, F. Altenberend, J. Brandenburg, H. Kalbacher, R. Brock, C. Driessen, H. G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2005. Autophagy Promotes Mhc Class Ii Presentation of Peptides from Intracellular Source Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (22):7922-7.
- Denzin, L. K., and P. Cresswell. 1995. Hla-Dm Induces Clip Dissociation from Mhc Class Ii Alpha Beta Dimers and Facilitates Peptide Loading. *Cell* 82 (1):155-65.
- Denzin, L. K., J. L. Fallas, M. Prendes, and W. Yi. 2005. Right Place, Right Time, Right Peptide: Do Keeps Dm Focused. *Immunol Rev* 207:279-92.

- Denzin, L. K., D. B. Sant'Angelo, C. Hammond, M. J. Surman, and P. Cresswell. 1997. Negative Regulation by Hla-Do of Mhc Class Ii-Restricted Antigen Processing. *Science* 278 (5335):106-9.
- Deussing, J., W. Roth, P. Saftig, C. Peters, H. L. Ploegh, and J. A. Villadangos. 1998. Cathepsins B and D Are Dispensable for Major Histocompatibility Complex Class Ii-Mediated Antigen Presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (8):4516-21.
- Ding, Y. H., B. M. Baker, D. N. Garboczi, W. E. Biddison, and D. C. Wiley. 1999. Four A6-Tcr/Peptide/Hla-A2 Structures That Generate Very Different T Cell Signals Are Nearly Identical. *Immunity* 11 (1):45-56.
- Ding, Y. H., K. J. Smith, D. N. Garboczi, U. Utz, W. E. Biddison, and 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 (4):403-11.
- Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, and J. S. Mattick. 1991. 'Touchdown' Pcr to Circumvent Spurious Priming During Gene Amplification. *Nucleic Acids Res* 19 (14):4008.
- Dongre, A. R., S. Kovats, P. deRoos, A. L. McCormack, T. Nakagawa, V. Paharkova-Vatchkova, J. Eng, H. Caldwell, J. R. Yates, 3rd, and A. Y. Rudensky. 2001. In Vivo Mhc Class Ii Presentation of Cytosolic Proteins Revealed by Rapid Automated Tandem Mass Spectrometry and Functional Analyses. *Eur J Immunol* 31 (5):1485-94.
- Druml, Wilfred. 2002. The Beginning of Organ Transplantation:Emerich Ullmann (1861-1937). *Wien Klin Wochenschr* 114 (4):128-137.
- Dudley, D. D., J. Chaudhuri, C. H. Bassing, and F. W. Alt. 2005. Mechanism and Control of V(D)J Recombination Versus Class Switch Recombination: Similarities and Differences. *Adv Immunol* 86:43-112.
- Dupont, P.J., P.E. Herbert, and A.N. Warrens. 2003. Mécanismes De La Reconnaissance Allogénique. In *Actualités Néphrologiques Jean Hamburger De L'hôpital Necker 2003*, edited by A. n. d. l. H. Necker: FLAMMARION MEDECINE SCIENCES.
- Early, P., H. Huang, M. Davis, K. Calame, and L. Hood. 1980. An Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Gene Is Generated from Three Segments of DNA: Vh, D and Jh. *Cell* 19 (4):981-92.
- Elliott, T. J., and H. N. Eisen. 1990. Cytotoxic T Lymphocytes Recognize a Reconstituted Class I Histocompatibility Antigen (Hla-A2) as an Allogeneic Target Molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (13):5213-7.
- Elliott, T., and A. Williams. 2005. The Optimization of Peptide Cargo Bound to Mhc Class I Molecules by the Peptide-Loading Complex. *Immunol Rev* 207:89-99.
- Ensminger, S. M., B. M. Spriewald, O. Witzke, O. E. Pajaro, M. H. Yacoub, P. J. Morris, M. L. Rose, and K. J. Wood. 2002. Indirect Allorecognition Can Play an Important Role in the Development of Transplant Arteriosclerosis. *Transplantation* 73 (2):279-86.
- Evavold, B. D., J. Sloan-Lancaster, and P. M. Allen. 1994. Antagonism of Superantigen-Stimulated Helper T-Cell Clones and Hybridomas by Altered Peptide Ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (6):2300-4.
- Evavold, B. D., J. Sloan-Lancaster, K. J. Wilson, J. B. Rothbard, and P. M. Allen. 1995. Specific T Cell Recognition of Minimally Homologous Peptides: Evidence for Multiple Endogenous Ligands. *Immunity* 2 (6):655-63.

- Evavold, B. D., S. G. Williams, B. L. Hsu, S. Buus, and P. M. Allen. 1992. Complete Dissection of the Hb(64-76) Determinant Using T Helper 1, T Helper 2 Clones, and T Cell Hybridomas. *J Immunol* 148 (2):347-53.
- Fairchild, P. J. 1998. Presentation of Antigenic Peptides by Products of the Major Histocompatibility Complex. *J Pept Sci* 4 (3):182-94.
- Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1991. Allele-Specific Motifs Revealed by Sequencing of Self-Peptides Eluted from Mhc Molecules. *Nature* 351 (6324):290-6.
- Fangmann, J., R. Dalchau, and J. W. Fabre. 1992. Rejection of Skin Allografts by Indirect Allorecognition of Donor Class I Major Histocompatibility Complex Peptides. *J Exp Med* 175 (6):1521-9.
- Fangmann, J., R. Dalchau, G. J. Sawyer, C. A. Priestley, and J. W. Fabre. 1992. T Cell Recognition of Donor Major Histocompatibility Complex Class I Peptides During Allograft Rejection. *Eur J Immunol* 22 (6):1525-30.
- Fehling, H. J., A. Krotkova, C. Saint-Ruf, and H. von Boehmer. 1995. Crucial Role of the Pre-T-Cell Receptor Alpha Gene in Development of Alpha Beta but Not Gamma Delta T Cells. *Nature* 375 (6534):795-8.
- Felix, N. J., and P. M. Allen. 2007. Specificity of T-Cell Alloreactivity. *Nat Rev Immunol* 7 (12):942-53.
- Felix, N. J., D. L. Donermeyer, S. Horvath, J. J. Walters, M. L. Gross, A. Suri, and P. M. Allen. 2007. Alloreactive T Cells Respond Specifically to Multiple Distinct Peptide-Mhc Complexes. *Nat Immunol* 8 (4):388-97.
- Felix, N. J., A. Suri, J. J. Walters, S. Horvath, M. L. Gross, and P. M. Allen. 2006. I-Ep-Bound Self-Peptides: Identification, Characterization, and Role in Alloreactivity. *J Immunol* 176 (2):1062-71.
- Fiebigler, E., R. Maehr, J. Villadangos, E. Weber, A. Erickson, E. Bikoff, H. L. Ploegh, and A. M. Lennon-Dumenil. 2002. Invariant Chain Controls the Activity of Extracellular Cathepsin L. *J Exp Med* 196 (9):1263-9.
- Fleischhauer, K., N. A. Kernan, R. J. O'Reilly, B. Dupont, and S. Y. Yang. 1990. Bone Marrow-Allograft Rejection by T Lymphocytes Recognizing a Single Amino Acid Difference in Hla-B44. *N Engl J Med* 323 (26):1818-22.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin, and H. B. Schioth. 2003. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* 63 (6):1256-72.
- Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, P. Marrack, and J. Kappler. 1996. Structures of an Mhc Class II Molecule with Covalently Bound Single Peptides. *Science* 272 (5264):1001-4.
- Gallegos, A. M., and M. J. Bevan. 2004. Central Tolerance to Tissue-Specific Antigens Mediated by Direct and Indirect Antigen Presentation. *J Exp Med* 200 (8):1039-49.
- Garboczi, D. N., P. Ghosh, U. Utz, Q. R. Fan, W. E. Biddison, and D. C. Wiley. 1996. Structure of the Complex between Human T-Cell Receptor, Viral Peptide and Hla-A2. *Nature* 384 (6605):134-41.
- Garcia, K. C., and E. J. Adams. 2005. How the T Cell Receptor Sees Antigen--a Structural View. *Cell* 122 (3):333-6.

- Garcia, K. C., M. Degano, L. R. Pease, M. Huang, P. A. Peterson, L. Teyton, and I. A. Wilson. 1998. Structural Basis of Plasticity in T Cell Receptor Recognition of a Self Peptide-Mhc Antigen. *Science* 279 (5354):1166-72.
- Garcia, K. C., M. Degano, J. A. Speir, and I. A. Wilson. 1999. Emerging Principles for T Cell Receptor Recognition of Antigen in Cellular Immunity. *Rev Immunogenet* 1 (1):75-90.
- Garcia, K. C., M. Degano, R. L. Stanfield, A. Brunmark, M. R. Jackson, P. A. Peterson, L. Teyton, and I. A. Wilson. 1996. An Alphabeta T Cell Receptor Structure at 2.5 Å and Its Orientation in the Tcr-Mhc Complex. *Science* 274 (5285):209-19.
- Garcia, K. C., L. Teyton, and I. A. Wilson. 1999. Structural Basis of T Cell Recognition. *Annu Rev Immunol* 17:369-97.
- Ghosh, P., M. Amaya, E. Mellins, and D. C. Wiley. 1995. The Structure of an Intermediate in Class II Mhc Maturation: Clip Bound to Hla-Dr3. *Nature* 378 (6556):457-62.
- Gibson, T., and P. B. Medawar. 1943. The Fate of Skin Homografts in Man. *J Anat* 77 (Pt 4):299-310 4.
- Gil, D., A. G. Schrum, B. Alarcon, and E. Palmer. 2005. T Cell Receptor Engagement by Peptide-Mhc Ligands Induces a Conformational Change in the Cd3 Complex of Thymocytes. *J Exp Med* 201 (4):517-22.
- Glithero, A., J. Tormo, K. Doering, M. Kojima, E. Y. Jones, and T. Elliott. 2006. The Crystal Structure of H-2d(B) Complexed with a Partial Peptide Epitope Suggests a Major Histocompatibility Complex Class I Assembly Intermediate. *J Biol Chem* 281 (18):12699-704.
- Gober, H. J., M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori, and G. De Libero. 2003. Human T Cell Receptor Gammadelta Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *J Exp Med* 197 (2):163-8.
- Gokmen, M. R., G. Lombardi, and R. I. Lechler. 2008. The Importance of the Indirect Pathway of Allorecognition in Clinical Transplantation. *Curr Opin Immunol* 20 (5):568-74.
- Goldrath, A. W., and M. J. Bevan. 1999. Selecting and Maintaining a Diverse T-Cell Repertoire. *Nature* 402 (6759):255-62.
- Graf, D., S. Nethisinghe, D. B. Palmer, A. G. Fisher, and M. Merckenschlager. 2002. The Developmentally Regulated Expression of Twisted Gastrulation Reveals a Role for Bone Morphogenetic Proteins in the Control of T Cell Development. *J Exp Med* 196 (2):163-71.
- Grakoui, A., D. L. Donermeyer, O. Kanagawa, K. M. Murphy, and P. M. Allen. 1999. Tcr-Independent Pathways Mediate the Effects of Antigen Dose and Altered Peptide Ligands on Th Cell Polarization. *J Immunol* 162 (4):1923-30.
- Grawunder, U., R. B. West, and M. R. Lieber. 1998. Antigen Receptor Gene Rearrangement. *Curr Opin Immunol* 10 (2):172-80.
- Groettrup, M., K. Ungewiss, O. Azogui, R. Palacios, M. J. Owen, A. C. Hayday, and H. von Boehmer. 1993. A Novel Disulfide-Linked Heterodimer on Pre-T Cells Consists of the T Cell Receptor Beta Chain and a 33 Kd Glycoprotein. *Cell* 75 (2):283-94.
- Grujic, M., P. J. Holst, J. P. Christensen, and A. R. Thomsen. 2009. Fusion of a Viral Antigen to Invariant Chain Leads to Augmented T-Cell Immunity and Improved Protection in Gene-Gun DNA-Vaccinated Mice. *J Gen Virol* 90 (Pt 2):414-22.

- Guimezanes, A., G. A. Barrett-Wilt, P. Gulden-Thompson, J. Shabanowitz, V. H. Engelhard, D. F. Hunt, and A. M. Schmitt-Verhulst. 2001. Identification of Endogenous Peptides Recognized by in Vivo or in Vitro Generated Alloreactive Cytotoxic T Lymphocytes: Distinct Characteristics Correlated with Cd8 Dependence. *Eur J Immunol* 31 (2):421-32.
- Gutierrez, M. G., S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo, and V. Deretic. 2004. Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting Bcg and Mycobacterium Tuberculosis Survival in Infected Macrophages. *Cell* 119 (6):753-66.
- Hahn, M., M. J. Nicholson, J. Pyrdol, and K. W. Wucherpfennig. 2005. Unconventional Topology of Self Peptide-Major Histocompatibility Complex Binding by a Human Autoimmune T Cell Receptor. *Nat Immunol* 6 (5):490-6.
- Haque, A., L. M. Hajiaghamohseni, P. Li, K. Toomy, and J. S. Blum. 2007. Invariant Chain Modulates Hla Class Ii Protein Recycling and Peptide Presentation in Nonprofessional Antigen Presenting Cells. *Cell Immunol* 249 (1):20-9.
- Hare, B. J., D. F. Wyss, M. S. Osburne, P. S. Kern, E. L. Reinherz, and G. Wagner. 1999. Structure, Specificity and Cdr Mobility of a Class Ii Restricted Single-Chain T-Cell Receptor. *Nat Struct Biol* 6 (6):574-81.
- Heath, W. R., K. P. Kane, M. F. Mescher, and L. A. Sherman. 1991. Alloreactive T Cells Discriminate among a Diverse Set of Endogenous Peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (12):5101-5.
- Heemskerk, M. B., J. J. Cornelissen, D. L. Roelen, J. J. van Rood, F. H. Claas, Doxiadis, II, and M. Oudshoorn. 2007. Highly Diverged Mhc Class I Mismatches Are Acceptable for Haematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 40 (3):193-200.
- Heemskerk, M. B., D. L. Roelen, M. K. Dankers, J. J. van Rood, F. H. Claas, Doxiadis, II, and M. Oudshoorn. 2005. Allogeneic Mhc Class I Molecules with Numerous Sequence Differences Do Not Elicit a Ctl Response. *Hum Immunol* 66 (9):969-76.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-Like Receptor Recognizes Bacterial DNA. *Nature* 408 (6813):740-5.
- Hennecke, J., A. Carfi, and 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 (21):5611-24.
- Hennecke, J., and D. C. Wiley. 2002. Structure of a Complex of the Human Alpha/Beta T Cell Receptor (Tcr) Ha1.7, Influenza Hemagglutinin Peptide, and Major Histocompatibility Complex Class Ii Molecule, Hla-Dr4 (Dra*0101 and Drb1*0401): Insight into Tcr Cross-Restriction and Alloreactivity. *J Exp Med* 195 (5):571-81.
- Henry, R. M., A. D. Hoppe, N. Joshi, and J. A. Swanson. 2004. The Uniformity of Phagosome Maturation in Macrophages. *J Cell Biol* 164 (2):185-94.
- Herman, J., V. Jongeneel, D. Kuznetsov, and P. G. Coulie. 1999. Differences in the Recognition by Ctl of Peptides Presented by the Hla-B*4402 and the Hla-B*4403 Molecules Which Differ by a Single Amino Acid. *Tissue Antigens* 53 (2):111-21.
- Hernandez-Munain, C., B. P. Sleckman, and M. S. Krangel. 1999. A Developmental Switch from Tcr Delta Enhancer to Tcr Alpha Enhancer Function During Thymocyte Maturation. *Immunity* 10 (6):723-33.

- Higuchi, R., B. Krummel, and R. K. Saiki. 1988. A General Method of in Vitro Preparation and Specific Mutagenesis of DNA Fragments: Study of Protein and DNA Interactions. *Nucleic Acids Res* 16 (15):7351-67.
- Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Site-Directed Mutagenesis by Overlap Extension Using the Polymerase Chain Reaction. *Gene* 77 (1):51-9.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T Cell Receptor Antagonist Peptides Induce Positive Selection. *Cell* 76 (1):17-27.
- Honey, K., M. Duff, C. Beers, W. H. Brissette, E. A. Elliott, C. Peters, M. Maric, P. Cresswell, and A. Rudensky. 2001. Cathepsin S Regulates the Expression of Cathepsin L and the Turnover of Gamma-Interferon-Inducible Lysosomal Thiol Reductase in B Lymphocytes. *J Biol Chem* 276 (25):22573-8.
- Honey, K., and A. Y. Rudensky. 2003. Lysosomal Cysteine Proteases Regulate Antigen Presentation. *Nat Rev Immunol* 3 (6):472-82.
- Hornell, T. M., S. M. Martin, N. B. Myers, and J. M. Connolly. 2001. Peptide Length Variants P2ca and Q19 Present Distinct Conformations to L(D)-Specific T Cells. *J Immunol* 167 (8):4207-14.
- Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Engineering Hybrid Genes without the Use of Restriction Enzymes: Gene Splicing by Overlap Extension. *Gene* 77 (1):61-8.
- Housset, D., and B. Malissen. 2003. What Do Tcr-Pmhc Crystal Structures Teach Us About Mhc Restriction and Alloreactivity? *Trends Immunol* 24 (8):429-37.
- Howarth, M., A. Williams, A. B. Tolstrup, and T. Elliott. 2004. Tapasin Enhances Mhc Class I Peptide Presentation According to Peptide Half-Life. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (32):11737-42.
- Hu, Q., C. R. Bazemore Walker, C. Girao, J. T. Opferman, J. Sun, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and P. G. Ashton-Rickardt. 1997. Specific Recognition of Thymic Self-Peptides Induces the Positive Selection of Cytotoxic T Lymphocytes. *Immunity* 7 (2):221-31.
- Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. 2000. A Discrete Subpopulation of Dendritic Cells Transports Apoptotic Intestinal Epithelial Cells to T Cell Areas of Mesenteric Lymph Nodes. *J Exp Med* 191 (3):435-44.
- Hunt, D. F., R. A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevilir, A. L. Cox, E. Appella, and V. H. Engelhard. 1992. Characterization of Peptides Bound to the Class I Mhc Molecule Hla-A2.1 by Mass Spectrometry. *Science* 255 (5049):1261-3.
- Hunt, D. F., H. Michel, T. A. Dickinson, J. Shabanowitz, A. L. Cox, K. Sakaguchi, E. Appella, H. M. Grey, and A. Sette. 1992. Peptides Presented to the Immune System by the Murine Class II Major Histocompatibility Complex Molecule I-Ad. *Science* 256 (5065):1817-20.
- Huseby, E. S., J. White, F. Crawford, T. Vass, D. Becker, C. Pinilla, P. Marrack, and J. W. Kappler. 2005. How the T Cell Repertoire Becomes Peptide and Mhc Specific. *Cell* 122 (2):247-60.
- Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack. 1996. The Repertoire of T Cells Shaped by a Single Mhc/Peptide Ligand. *Cell* 84 (4):521-9.

- Ignatowicz, L., W. Rees, R. Pacholczyk, H. Ignatowicz, E. Kushnir, J. Kappler, and P. Marrack. 1997. T Cells Can Be Activated by Peptides That Are Unrelated in Sequence to Their Selecting Peptide. *Immunity* 7 (2):179-86.
- Inoko, H., A. Ando, M. Kimura, and K. Tsuji. 1985. Isolation and Characterization of the Cdna Clone and Genomic Clones of a New Hla Class II Antigen Heavy Chain, Do Alpha. *J Immunol* 135 (3):2156-9.
- Ismaili, J., V. Orlislagers, R. Poupot, J. J. Fournie, and M. Goldman. 2002. Human Gamma Delta T Cells Induce Dendritic Cell Maturation. *Clin Immunol* 103 (3 Pt 1):296-302.
- Jameson, S. C., K. A. Hogquist, and M. J. Bevan. 1994. Specificity and Flexibility in Thymic Selection. *Nature* 369 (6483):750-2.
- Janeway, Charles. 2003. *Immunobiologie : Le Système Immunitaire Fondamental Et Pathologique*. 2e éd. française ed. Paris: De Boeck.
- Jensen, P. E. 2007. Recent Advances in Antigen Processing and Presentation. *Nat Immunol* 8 (10):1041-8.
- Johansson, U., L. Walther-Jallow, A. Smed-Sorensen, and A. L. Spetz. 2007. Triggering of Dendritic Cell Responses after Exposure to Activated, but Not Resting, Apoptotic Pbmcs. *J Immunol* 179 (3):1711-20.
- Jonsson, A. K., and L. Rask. 1989. Human Class II DNA and Dab Genes Display Low Sequence Variability. *Immunogenetics* 29 (6):411-3.
- Jorgensen, J. L., U. Esser, B. Fazekas de St Groth, P. A. Reay, and M. M. Davis. 1992. Mapping T-Cell Receptor-Peptide Contacts by Variant Peptide Immunization of Single-Chain Transgenics. *Nature* 355 (6357):224-30.
- Kanaseki, T., N. Blanchard, G. E. Hammer, F. Gonzalez, and N. Shastri. 2006. Eraap Synergizes with Mhc Class I Molecules to Make the Final Cut in the Antigenic Peptide Precursors in the Endoplasmic Reticulum. *Immunity* 25 (5):795-806.
- Kappler, J. W., N. Roehm, and P. Marrack. 1987. T Cell Tolerance by Clonal Elimination in the Thymus. *Cell* 49 (2):273-80.
- Katz, D. H., M. Graves, M. E. Dorf, H. Dimuzio, and B. Benacerraf. 1975. Cell Interactions between Histoincompatible T and B Lymphocytes. VII. Cooperative Responses between Lymphocytes Are Controlled by Genes in the I Region of the H-2 Complex. *J Exp Med* 141 (1):263-8.
- Khor, B., and B. P. Sleckman. 2005. Intra- and Inter-Allelic Ordering of T Cell Receptor Beta Chain Gene Assembly. *Eur J Immunol* 35 (3):964-70.
- Kim, K. S., Z. Y. Sun, G. Wagner, and E. L. Reinherz. 2000. Heterodimeric Cd3epsilon-gamma Extracellular Domain Fragments: Production, Purification and Structural Analysis. *J Mol Biol* 302 (4):899-916.
- Kim, M. G., C. Chen, M. S. Lyu, E. G. Cho, D. Park, C. Kozak, and R. H. Schwartz. 1999. Cloning and Chromosomal Mapping of a Gene Isolated from Thymic Stromal Cells Encoding a New Mouse Type II Membrane Serine Protease, Epithin, Containing Four Ldl Receptor Modules and Two Cub Domains. *Immunogenetics* 49 (5):420-8.
- Kindt, Thomas J., Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne, and Janis Kuby. 2008. *Immunologie : Le Cours De Janis Kuby ; Avec Questions De Révision*. 6e éd. ed, Sciences Sup. Sciences De La Vie. Paris: Dunod.
- Kishimoto, H., and J. Sprent. 1997. Negative Selection in the Thymus Includes Semimature T Cells. *J Exp Med* 185 (2):263-71.

- Kisielow, P., H. Bluthmann, U. D. Staerz, M. Steinmetz, and H. von Boehmer. 1988. Tolerance in T-Cell-Receptor Transgenic Mice Involves Deletion of Nonmature Cd4+8+ Thymocytes. *Nature* 333 (6175):742-6.
- Kjer-Nielsen, L., C. S. Clements, A. W. Purcell, A. G. Brooks, J. C. Whisstock, S. R. Burrows, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2003. A Structural Basis for the Selection of Dominant Alphabeta T Cell Receptors in Antiviral Immunity. *Immunity* 18 (1):53-64.
- Klabunde, T., and G. Hessler. 2002. Drug Design Strategies for Targeting G-Protein-Coupled Receptors. *Chembiochem* 3 (10):928-44.
- Kloetzel, P. M. 2004. Generation of Major Histocompatibility Complex Class I Antigens: Functional Interplay between Proteasomes and Tppii. *Nat Immunol* 5 (7):661-9.
- Koning, F., W. L. Maloy, and J. E. Coligan. 1990. The Implications of Subunit Interactions for the Structure of the T Cell Receptor-Cd3 Complex. *Eur J Immunol* 20 (2):299-305.
- Kosmrlj, A., A. K. Jha, E. S. Huseby, M. Kardar, and A. K. Chakraborty. 2008. How the Thymus Designs Antigen-Specific and Self-Tolerant T Cell Receptor Sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (43):16671-6.
- Krangel, M. S. 2003. Gene Segment Selection in V(D)J Recombination: Accessibility and Beyond. *Nat Immunol* 4 (7):624-30.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, C. Thery, E. A. Armandola, B. C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena, and G. J. Hammerling. 1998. A Role for Hla-Do as a Co-Chaperone of Hla-Dm in Peptide Loading of Mhc Class Ii Molecules. *EMBO J* 17 (11):2971-81.
- Kuby, Janis, Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt, and Barbara Anne Osborne. 2001. *Immunologie : Le Cours De Janis Kuby : Avec Questions De Révision, Sciences Sup.* Paris: Dunod.
- Kyewski, B., and L. Klein. 2006. A Central Role for Central Tolerance. *Annu Rev Immunol* 24:571-606.
- Larocque, Suzie. 2004. *Modulation Du Rejet De Greffe Par Des Peptides Antagonistes, Mémoire De Maîtrise (Université Du Québec. Institut National De La Recherche Scientifique)*. Sainte-Foy: Université du Québec Institut national de la recherche scientifique.
- Larsen, C. P., R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, D. F. Hankins, P. J. Morris, and J. M. Austyn. 1990. Migration and Maturation of Langerhans Cells in Skin Transplants and Explants. *J Exp Med* 172 (5):1483-93.
- Lazarski, C. A., F. A. Chaves, S. A. Jenks, S. Wu, K. A. Richards, J. M. Weaver, and A. J. Sant. 2005. The Kinetic Stability of Mhc Class Ii:Peptide Complexes Is a Key Parameter That Dictates Immunodominance. *Immunity* 23 (1):29-40.
- Lazarski, C. A., F. A. Chaves, and A. J. Sant. 2006. The Impact of Dm on Mhc Class Ii-Restricted Antigen Presentation Can Be Altered by Manipulation of Mhc-Peptide Kinetic Stability. *J Exp Med* 203 (5):1319-28.
- Le Moine, A., M. Goldman, and D. Abramowicz. 2002. Multiple Pathways to Allograft Rejection. *Transplantation* 73 (9):1373-81.
- Lechler, R. I., G. Lombardi, J. R. Batchelor, N. Reinsmoen, and F. H. Bach. 1990. The Molecular Basis of Alloreactivity. *Immunol Today* 11 (3):83-8.

- Lenhoff, S.G.H.M and Lenhoff, H.M. 1984. Tissue Grafting in Animals: Its Discovery in 1742 by Abraham Trembley as He Experimented with Hydra. *Biological Bulletin* 166:1-10.
- Lennon-Dumenil, A. M., R. A. Roberts, K. Valentijn, C. Driessen, H. S. Overkleeft, A. Erickson, P. J. Peters, E. Bikoff, H. L. Ploegh, and P. Wolf Bryant. 2001. The P41 Isoform of Invariant Chain Is a Chaperone for Cathepsin L. *EMBO J* 20 (15):4055-64.
- Levelt, C. N., E. Mizoguchi, X. Huang, R. Zacks, A. K. Bhan, and S. Tonegawa. 1998. Inhibition of Intrathymic T Cell Development by Expression of a Transgenic Antagonist Peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (24):14349-54.
- Lewis, J. W., and T. Elliott. 1998. Evidence for Successive Peptide Binding and Quality Control Stages During Mhc Class I Assembly. *Curr Biol* 8 (12):717-20.
- Li, Y., Y. Huang, J. Lue, J. A. Quandt, R. Martin, and R. A. Mariuzza. 2005. Structure of a Human Autoimmune Tcr Bound to a Myelin Basic Protein Self-Peptide and a Multiple Sclerosis-Associated Mhc Class Ii Molecule. *EMBO J* 24 (17):2968-79.
- Liljedahl, M., T. Kuwana, W. P. Fung-Leung, M. R. Jackson, P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1996. Hla-Do Is a Lysosomal Resident Which Requires Association with Hla-Dm for Efficient Intracellular Transport. *EMBO J* 15 (18):4817-24.
- Liljedahl, M., O. Winqvist, C. D. Surh, P. Wong, K. Ngo, L. Teyton, P. A. Peterson, A. Brunmark, A. Y. Rudensky, W. P. Fung-Leung, and L. Karlsson. 1998. Altered Antigen Presentation in Mice Lacking H2-O. *Immunity* 8 (2):233-43.
- Lindahl, K. F., and D. B. Wilson. 1977. Histocompatibility Antigen-Activated Cytotoxic T Lymphocytes. Ii. Estimates of the Frequency and Specificity of Precursors. *J Exp Med* 145 (3):508-22.
- Ling, Y. M., M. H. Shaw, C. Ayala, I. Coppens, G. A. Taylor, D. J. Ferguson, and G. S. Yap. 2006. Vacuolar and Plasma Membrane Stripping and Autophagic Elimination of Toxoplasma Gondii in Primed Effector Macrophages. *J Exp Med* 203 (9):2063-71.
- List, K., C. C. Haudenschild, R. Szabo, W. Chen, S. M. Wahl, W. Swaim, L. H. Engelholm, N. Behrendt, and T. H. Bugge. 2002. Matriptase/Mt-Sp1 Is Required for Postnatal Survival, Epidermal Barrier Function, Hair Follicle Development, and Thymic Homeostasis. *Oncogene* 21 (23):3765-79.
- Liston, A., D. H. Gray, S. Lesage, A. L. Fletcher, J. Wilson, K. E. Webster, H. S. Scott, R. L. Boyd, L. Peltonen, and C. C. Goodnow. 2004. Gene Dosage--Limiting Role of Aire in Thymic Expression, Clonal Deletion, and Organ-Specific Autoimmunity. *J Exp Med* 200 (8):1015-26.
- Little, A. M., and P. Parham. 1999. Polymorphism and Evolution of Hla Class I and Ii Genes and Molecules. *Rev Immunogenet* 1 (1):105-23.
- Lleo, A., C. Selmi, P. Invernizzi, M. Podda, and M. E. Gershwin. 2008. The Consequences of Apoptosis in Autoimmunity. *J Autoimmun* 31 (3):257-62.
- Lodish, Harvey F. 2005. *Biologie Moléculaire De La Cellule*. 3e éd. ed. Bruxelles: De Boeck.
- Lombardi, G., S. Sidhu, J. R. Batchelor, and R. I. Lechler. 1989. Allorecognition of Dr1 by T Cells from a Dr4/Drw13 Responder Mimics Self-Restricted Recognition of Endogenous Peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (11):4190-4.

- Lopez, D., S. Rojo, V. Calvo, and J. A. Lopez de Castro. 1992. Peptide-Presenting Similarities among Functionally Distant Hla-B27 Subtypes Revealed by Alloreactive T Lymphocytes of Unusual Specificity. *J Immunol* 148 (4):996-1002.
- Lorenz, R. G., and P. M. Allen. 1988. Direct Evidence for Functional Self-Protein/Ia-Molecule Complexes in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (14):5220-3.
- . 1989. Thymic Cortical Epithelial Cells Can Present Self-Antigens in Vivo. *Nature* 337 (6207):560-2.
- Luz, J. G., M. Huang, K. C. Garcia, M. G. Rudolph, V. Apostolopoulos, L. Teyton, and I. A. Wilson. 2002. Structural Comparison of Allogeneic and Syngeneic T Cell Receptor-Peptide-Major Histocompatibility Complex Complexes: A Buried Alloreactive Mutation Subtly Alters Peptide Presentation Substantially Increasing V(Beta) Interactions. *J Exp Med* 195 (9):1175-86.
- Macdonald, W. A., A. W. Purcell, N. A. Mifsud, L. K. Ely, D. S. Williams, L. Chang, J. J. Gorman, C. S. Clements, L. Kjer-Nielsen, D. M. Koelle, S. R. Burrows, B. D. Tait, R. Holdsworth, A. G. Brooks, G. O. Lovrecz, L. Lu, J. Rossjohn, and J. McCluskey. 2003. A Naturally Selected Dimorphism within the Hla-B44 Supertype Alters Class I Structure, Peptide Repertoire, and T Cell Recognition. *J Exp Med* 198 (5):679-91.
- Madden, D. R., D. N. Garboczi, and D. C. Wiley. 1993. The Antigenic Identity of Peptide-Mhc Complexes: A Comparison of the Conformations of Five Viral Peptides Presented by Hla-A2. *Cell* 75 (4):693-708.
- Maehr, R., H. C. Hang, J. D. Mintern, Y. M. Kim, A. Cuvillier, M. Nishimura, K. Yamada, K. Shirahama-Noda, I. Hara-Nishimura, and H. L. Ploegh. 2005. Asparagine Endopeptidase Is Not Essential for Class II Mhc Antigen Presentation but Is Required for Processing of Cathepsin L in Mice. *J Immunol* 174 (11):7066-74.
- Malarkannan, S., M. Afkarian, and N. Shastri. 1995. A Rare Cryptic Translation Product Is Presented by Kb Major Histocompatibility Complex Class I Molecule to Alloreactive T Cells. *J Exp Med* 182 (6):1739-50.
- Manning, T. C., C. J. Schlueter, T. C. Brodnicki, E. A. Parke, J. A. Speir, K. C. Garcia, L. Teyton, I. A. Wilson, and D. M. Kranz. 1998. Alanine Scanning Mutagenesis of an Alphabeta T Cell Receptor: Mapping the Energy of Antigen Recognition. *Immunity* 8 (4):413-25.
- Manolios, N., F. Letourneur, J. S. Bonifacino, and R. D. Klausner. 1991. Pairwise, Cooperative and Inhibitory Interactions Describe the Assembly and Probable Structure of the T-Cell Antigen Receptor. *EMBO J* 10 (7):1643-51.
- Manoury, B., E. W. Hewitt, N. Morrice, P. M. Dando, A. J. Barrett, and C. Watts. 1998. An Asparaginyl Endopeptidase Processes a Microbial Antigen for Class II Mhc Presentation. *Nature* 396 (6712):695-9.
- Manoury, B., D. Mazzeo, D. N. Li, J. Billson, K. Loak, P. Benaroch, and C. Watts. 2003. Asparagine Endopeptidase Can Initiate the Removal of the Mhc Class II Invariant Chain Chaperone. *Immunity* 18 (4):489-98.
- Mansky, L. M., and H. M. Temin. 1994. Lower Mutation Rate of Bovine Leukemia Virus Relative to That of Spleen Necrosis Virus. *J Virol* 68 (1):494-9.
- Maric, M. A., M. D. Taylor, and J. S. Blum. 1994. Endosomal Aspartic Proteinases Are Required for Invariant-Chain Processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (6):2171-5.

- Martinez-Gomez, J. M., P. Johansen, H. Rose, M. Steiner, G. Senti, C. Rhyner, R. Cramer, and T. M. Kundig. 2009. Targeting the Mhc Class II Pathway of Antigen Presentation Enhances Immunogenicity and Safety of Allergen Immunotherapy. *Allergy* 64 (1):172-8.
- Mascarenhas, L., R. Stripecke, S. S. Case, D. Xu, K. I. Weinberg, and D. B. Kohn. 1998. Gene Delivery to Human B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Blood* 92 (10):3537-45.
- Matzinger, P., and M. J. Bevan. 1977. Hypothesis: Why Do So Many Lymphocytes Respond to Major Histocompatibility Antigens? *Cell Immunol* 29 (1):1-5.
- Matzinger, P., R. Zamoyska, and H. Waldmann. 1984. Self Tolerance Is H-2-Restricted. *Nature* 308 (5961):738-41.
- Maynard, J., K. Petersson, D. H. Wilson, E. J. Adams, S. E. Blondelle, M. J. Boulanger, D. B. Wilson, and K. C. Garcia. 2005. Structure of an Autoimmune T Cell Receptor Complexed with Class II Peptide-Mhc: Insights into Mhc Bias and Antigen Specificity. *Immunity* 22 (1):81-92.
- Mazza, C., N. Auphan-Anezin, C. Gregoire, A. Guimezanes, C. Kellenberger, A. Roussel, A. Kearney, P. A. van der Merwe, A. M. Schmitt-Verhulst, and B. Malissen. 2007. How Much Can a T-Cell Antigen Receptor Adapt to Structurally Distinct Antigenic Peptides? *EMBO J* 26 (7):1972-83.
- McBlane, J. F., D. C. van Gent, D. A. Ramsden, C. Romeo, C. A. Cuomo, M. Gellert, and M. A. Oettinger. 1995. Cleavage at a V(D)J Recombination Signal Requires Only Rag1 and Rag2 Proteins and Occurs in Two Steps. *Cell* 83 (3):387-95.
- Medawar, P. B. 1944. The Behaviour and Fate of Skin Autografts and Skin Homografts in Rabbits: A Report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat* 78 (Pt 5):176-99.
- Mendiratta, S. K., J. P. Kovalik, S. Hong, N. Singh, W. D. Martin, and L. Van Kaer. 1999. Peptide Dependency of Alloreactive Cd4+ T Cell Responses. *Int Immunol* 11 (3):351-60.
- Merad, M., M. Collin, and J. Bromberg. 2007. Dendritic Cell Homeostasis and Trafficking in Transplantation. *Trends Immunol* 28 (8):353-9.
- Merkenschlager, M., D. Graf, M. Lovatt, U. Bommhardt, R. Zamoyska, and A. G. Fisher. 1997. How Many Thymocytes Audition for Selection? *J Exp Med* 186 (7):1149-58.
- Mihelic, M., A. Dobersek, G. Guncar, and D. Turk. 2008. Inhibitory Fragment from the P41 Form of Invariant Chain Can Regulate Activity of Cysteine Cathepsins in Antigen Presentation. *J Biol Chem* 283 (21):14453-60.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi. 2004. In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Mol Biol Cell* 15 (3):1101-11.
- Morgan, J. A. 1951. The Influence for Cortisone on the Survival of Homografts of Skin in the Rabbit. *Surgery* 30 (3):506-15.
- Moris, A., V. Teichgraber, L. Gauthier, H. J. Buhring, and H. G. Rammensee. 2001. Cutting Edge: Characterization of Allorestricted and Peptide-Selective Alloreactive T Cells Using Hla-Tetramer Selection. *J Immunol* 166 (8):4818-21.
- Morkowski, S., A. W. Goldrath, S. Eastman, L. Ramachandra, D. C. Freed, P. Whiteley, and A Yu Rudensky. 1995. T Cell Recognition of Major Histocompatibility

- Complex Class II Complexes with Invariant Chain Processing Intermediates. *J Exp Med* 182 (5):1403-13.
- Munz, C., R. M. Steinman, and S. Fujii. 2005. Dendritic Cell Maturation by Innate Lymphocytes: Coordinated Stimulation of Innate and Adaptive Immunity. *J Exp Med* 202 (2):203-7.
- Myers, T. W., and D. H. Gelfand. 1991. Reverse Transcription and DNA Amplification by a *Thermus Thermophilus* DNA Polymerase. *Biochemistry* 30 (31):7661-6.
- Nadir, E., H. Margalit, T. Gallily, and S. A. Ben-Sasson. 1996. Microsatellite Spreading in the Human Genome: Evolutionary Mechanisms and Structural Implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (13):6470-5.
- Nagaraj, S., J. Neumann, B. Winzen, S. Frank, C. Ziske, E. Sievers, N. Koch, and I. G. Schmidt-Wolf. 2008. Pancreas Carcinoma Antigen Fused to Invariant Chain Elicits T-Cell Response and Tumor Growth Inhibition. *Pancreas* 37 (3):321-7.
- Nakagawa, I., A. Amano, N. Mizushima, A. Yamamoto, H. Yamaguchi, T. Kamimoto, A. Nara, J. Funao, M. Nakata, K. Tsuda, S. Hamada, and T. Yoshimori. 2004. Autophagy Defends Cells against Invading Group A Streptococcus. *Science* 306 (5698):1037-40.
- Nakagawa, T., W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters, and A. Y. Rudensky. 1998. Cathepsin L: Critical Role in II Degradation and Cd4 T Cell Selection in the Thymus. *Science* 280 (5362):450-3.
- Nakagawa, T. Y., W. H. Brissette, P. D. Lira, R. J. Griffiths, N. Petrushova, J. Stock, J. D. McNeish, S. E. Eastman, E. D. Howard, S. R. Clarke, E. F. Rosloniec, E. A. Elliott, and A. Y. Rudensky. 1999. Impaired Invariant Chain Degradation and Antigen Presentation and Diminished Collagen-Induced Arthritis in Cathepsin S Null Mice. *Immunity* 10 (2):207-17.
- Nakano, N., R. Rooke, C. Benoist, and D. Mathis. 1997. Positive Selection of T Cells Induced by Viral Delivery of Neopeptides to the Thymus. *Science* 275 (5300):678-83.
- Naruse, T. K., H. Kawata, T. Anzai, N. Takashige, M. Kagiya, Y. Nose, N. Nabeya, G. Isshiki, N. Tatsumi, and H. Inoko. 1999. Limited Polymorphism in the Hla-Doa Gene. *Tissue Antigens* 53 (4 Pt 1):359-65.
- Naruse, T. K., H. Kawata, H. Inoko, G. Isshiki, K. Yamano, M. Hino, and N. Tatsumi. 2002. The Hla-Dob Gene Displays Limited Polymorphism with Only One Amino Acid Substitution. *Tissue Antigens* 59 (6):512-9.
- Ober, B. T., Q. Hu, J. T. Opferman, S. Hagevik, N. Chiu, C. R. Wang, and P. G. Ashton-Rickardt. 2000. Affinity of Thymic Self-Peptides for the Tcr Determines the Selection of Cd8(+) T Lymphocytes in the Thymus. *Int Immunol* 12 (9):1353-63.
- Obst, R., C. Munz, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. 1998. Allo- and Self-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes against a Peptide Library: Evidence for a Functionally Diverse Allorestricted T Cell Repertoire. *Eur J Immunol* 28 (8):2432-43.
- Obst, R., N. Netuschil, K. Klopfer, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. 2000. The Role of Peptides in T Cell Alloreactivity Is Determined by Self-Major Histocompatibility Complex Molecules. *J Exp Med* 191 (5):805-12.
- Oehen, S., L. Feng, Y. Xia, C. D. Surh, and S. M. Hedrick. 1996. Antigen Compartmentation and T Helper Cell Tolerance Induction. *J Exp Med* 183 (6):2617-26.

- Oettinger, M. A., D. G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. 1990. Rag-1 and Rag-2, Adjacent Genes That Synergistically Activate V(D)J Recombination. *Science* 248 (4962):1517-23.
- Paludan, C., D. Schmid, M. Landthaler, M. Vockerodt, D. Kube, T. Tuschl, and C. Munz. 2005. Endogenous Mhc Class II Processing of a Viral Nuclear Antigen after Autophagy. *Science* 307 (5709):593-6.
- Panina-Bordignon, P., G. Corradin, E. Roosnek, A. Sette, and A. Lanzavecchia. 1991. Recognition by Class II Alloreactive T Cells of Processed Determinants from Human Serum Proteins. *Science* 252 (5012):1548-50.
- Pappalardo, J. S., V. Quattrocchi, C. Langellotti, S. Di Giacomo, V. Gnazzo, V. Olivera, G. Calamante, P. I. Zamorano, T. S. Levchenko, and V. P. Torchilin. 2009. Improved Transfection of Spleen-Derived Antigen-Presenting Cells in Culture Using Tatp-Liposomes. *J Control Release* 134 (1):41-46.
- Parkes, M., J. C. Barrett, N. J. Prescott, M. Tremelling, C. A. Anderson, S. A. Fisher, R. G. Roberts, E. R. Nimmo, F. R. Cummings, D. Soars, H. Drummond, C. W. Lees, S. A. Khawaja, R. Bagnall, D. A. Burke, C. E. Todhunter, T. Ahmad, C. M. Onnie, W. McArdle, D. Strachan, G. Bethel, C. Bryan, C. M. Lewis, P. Deloukas, A. Forbes, J. Sanderson, D. P. Jewell, J. Satsangi, J. C. Mansfield, L. Cardon, and C. G. Mathew. 2007. Sequence Variants in the Autophagy Gene Irgm and Multiple Other Replicating Loci Contribute to Crohn's Disease Susceptibility. *Nat Genet* 39 (7):830-2.
- Paulsson, K. M., M. Jevon, J. W. Wang, S. Li, and P. Wang. 2006. The Double Lysine Motif of Tapasin Is a Retrieval Signal for Retention of Unstable Mhc Class I Molecules in the Endoplasmic Reticulum. *J Immunol* 176 (12):7482-8.
- Pawlowski, T. J., M. D. Singleton, D. Y. Loh, R. Berg, and U. D. Staerz. 1996. Permissive Recognition During Positive Selection. *Eur J Immunol* 26 (4):851-7.
- Perraudau, M., P. R. Taylor, H. J. Stauss, R. Lindstedt, A. E. Bygrave, D. J. Pappin, S. Ellmerich, A. Whitten, D. Rahman, B. Canas, M. J. Walport, M. Botto, and D. M. Altmann. 2000. Altered Major Histocompatibility Complex Class II Peptide Loading in H2-O-Deficient Mice. *Eur J Immunol* 30 (10):2871-80.
- Pierre, P., and I. Mellman. 1998. Developmental Regulation of Invariant Chain Proteolysis Controls Mhc Class II Trafficking in Mouse Dendritic Cells. *Cell* 93 (7):1135-45.
- Pitcher, L. A., and N. S. van Oers. 2003. T-Cell Receptor Signal Transmission: Who Gives an Itam? *Trends Immunol* 24 (10):554-60.
- Pittet, M. J., A. Gati, F. A. Le Gal, G. Bioley, P. Guillaume, M. de Smedt, J. Plum, D. E. Speiser, J. C. Cerottini, P. Y. Dietrich, P. Romero, and A. Zippelius. 2006. Ex Vivo Characterization of Allo-Mhc-Restricted T Cells Specific for a Single Mhc-Peptide Complex. *J Immunol* 176 (4):2330-6.
- Pullen, J. K., R. M. Horton, Z. L. Cai, and L. R. Pease. 1992. Structural Diversity of the Classical H-2 Genes: K, D, and L. *J Immunol* 148 (3):953-67.
- Pullen, J. K., H. D. Hunt, R. M. Horton, and L. R. Pease. 1989. The Functional Significance of Two Amino Acid Polymorphisms in the Antigen-Presenting Domain of Class I Mhc Molecules. Molecular Dissection of Kb^{m3}. *J Immunol* 143 (5):1674-9.
- Rammensee, H. G., and M. J. Bevan. 1984. Evidence from in Vitro Studies That Tolerance to Self Antigens Is Mhc-Restricted. *Nature* 308 (5961):741-4.

- Reed, A. J., H. Noorchashm, S. Y. Rostami, Y. Zarrabi, A. R. Perate, A. N. Jeganathan, A. J. Caton, and A. Naji. 2003. Alloreactive Cd4 T Cell Activation in Vivo: An Autonomous Function of the Indirect Pathway of Alloantigen Presentation. *J Immunol* 171 (12):6502-9.
- 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, and J. Wang. 1999. The Crystal Structure of a T Cell Receptor in Complex with Peptide and Mhc Class Ii. *Science* 286 (5446):1913-21.
- Reiser, J. B., C. Darnault, C. Gregoire, T. Mosser, G. Mazza, A. Kearney, P. A. van der Merwe, J. C. Fontecilla-Camps, D. Housset, and B. Malissen. 2003. Cdr3 Loop Flexibility Contributes to the Degeneracy of Tcr Recognition. *Nat Immunol* 4 (3):241-7.
- Reiser, J. B., C. Darnault, A. Guimezanes, C. Gregoire, T. Mosser, A. M. Schmitt-Verhulst, J. C. Fontecilla-Camps, B. Malissen, D. Housset, and G. Mazza. 2000. Crystal Structure of a T Cell Receptor Bound to an Allogeneic Mhc Molecule. *Nat Immunol* 1 (4):291-7.
- Reiser, J. B., C. Gregoire, C. Darnault, T. Mosser, A. Guimezanes, A. M. Schmitt-Verhulst, J. C. Fontecilla-Camps, G. Mazza, B. Malissen, and D. Housset. 2002. A T Cell Receptor Cdr3beta Loop Undergoes Conformational Changes of Unprecedented Magnitude Upon Binding to a Peptide/Mhc Class I Complex. *Immunity* 16 (3):345-54.
- Reits, E., J. Neijssen, C. Herberths, W. Benckhuijsen, L. Janssen, J. W. Drijfhout, and J. Neefjes. 2004. A Major Role for Tppii in Trimming Proteasomal Degradation Products for Mhc Class I Antigen Presentation. *Immunity* 20 (4):495-506.
- Richards, D. M., S. L. Dalheimer, B. D. Ehst, T. L. Vanasek, M. K. Jenkins, M. I. Hertz, and D. L. Mueller. 2004. Indirect Minor Histocompatibility Antigen Presentation by Allograft Recipient Cells in the Draining Lymph Node Leads to the Activation and Clonal Expansion of Cd4+ T Cells That Cause Obliterative Airways Disease. *J Immunol* 172 (6):3469-79.
- Riese, R. J., R. N. Mitchell, J. A. Villadangos, G. P. Shi, J. T. Palmer, E. R. Karp, G. T. De Sanctis, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1998. Cathepsin S Activity Regulates Antigen Presentation and Immunity. *J Clin Invest* 101 (11):2351-63.
- Riese, R. J., P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1996. Essential Role for Cathepsin S in Mhc Class Ii-Associated Invariant Chain Processing and Peptide Loading. *Immunity* 4 (4):357-66.
- Rioux, J. D., R. J. Xavier, K. D. Taylor, M. S. Silverberg, P. Goyette, A. Huett, T. Green, P. Kuballa, M. M. Barmada, L. W. Datta, Y. Y. Shugart, A. M. Griffiths, S. R. Targan, A. F. Ippoliti, E. J. Bernard, L. Mei, D. L. Nicolae, M. Regueiro, L. P. Schumm, A. H. Steinhardt, J. I. Rotter, R. H. Duerr, J. H. Cho, M. J. Daly, and S. R. Brant. 2007. Genome-Wide Association Study Identifies New Susceptibility Loci for Crohn Disease and Implicates Autophagy in Disease Pathogenesis. *Nat Genet* 39 (5):596-604.
- Rocha, N., and J. Neefjes. 2008. Mhc Class Ii Molecules on the Move for Successful Antigen Presentation. *EMBO J* 27 (1):1-5.
- Roche, P. A., and P. Cresswell. 1990. Invariant Chain Association with Hla-Dr Molecules Inhibits Immunogenic Peptide Binding. *Nature* 345 (6276):615-8.

- Rock, K. L., I. A. York, and A. L. Goldberg. 2004. Post-Proteasomal Antigen Processing for Major Histocompatibility Complex Class I Presentation. *Nat Immunol* 5 (7):670-7.
- Rodriguez, G. M., and S. Diment. 1992. Role of Cathepsin D in Antigen Presentation of Ovalbumin. *J Immunol* 149 (9):2894-8.
- Rossjohn, J., and J. McCluskey. 2007. How a Home-Grown T Cell Receptor Interacts with a Foreign Landscape. *Cell* 129 (1):19-20.
- Rudensky, A. Y., S. M. Mazel, and V. L. Yurin. 1990. Presentation of Endogenous Immunoglobulin Determinant to Immunoglobulin-Recognizing T Cell Clones by the Thymic Cells. *Eur J Immunol* 20 (10):2235-9.
- Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, and I. A. Wilson. 2006. How Tcrs Bind Mhcs, Peptides, and Coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24:419-66.
- Rudolph, M. G., and I. A. Wilson. 2002. The Specificity of Tcr/Pmhc Interaction. *Curr Opin Immunol* 14 (1):52-65.
- Ruttimann, C., M. Cotoras, J. Zaldivar, and R. Vicuna. 1985. DNA Polymerases from the Extremely Thermophilic Bacterium *Thermus Thermophilus* Hb-8. *Eur J Biochem* 149 (1):41-6.
- Saint-Ruf, C., K. Ungewiss, M. Groettrup, L. Bruno, H. J. Fehling, and H. von Boehmer. 1994. Analysis and Expression of a Cloned Pre-T Cell Receptor Gene. *Science* 266 (5188):1208-12.
- Sakaguchi, N., T. Takahashi, H. Hata, T. Nomura, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Sakihama, T. Matsutani, I. Negishi, S. Nakatsuru, and S. Sakaguchi. 2003. Altered Thymic T-Cell Selection Due to a Mutation of the Zap-70 Gene Causes Autoimmune Arthritis in Mice. *Nature* 426 (6965):454-60.
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally Arising Cd4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-62.
- Sambrook, Joseph, E. F. Fritsch, and Tom Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sant'Angelo, D. B., and C. A. Janeway, Jr. 2002. Negative Selection of Thymocytes Expressing the D10 Tcr. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (10):6931-6.
- Sant, A. J., and J. Miller. 1994. Mhc Class Ii Antigen Processing: Biology of Invariant Chain. *Curr Opin Immunol* 6 (1):57-63.
- Sasada, T., Y. Ghendler, J. M. Neveu, W. S. Lane, and E. L. Reinherz. 2001. A Naturally Processed Mitochondrial Self-Peptide in Complex with Thymic Mhc Molecules Functions as a Selecting Ligand for a Viral-Specific T Cell Receptor. *J Exp Med* 194 (7):883-92.
- Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and D. Baltimore. 1989. The V(D)J Recombination Activating Gene, Rag-1. *Cell* 59 (6):1035-48.
- Schmid, D., and C. Munz. 2007. Innate and Adaptive Immunity through Autophagy. *Immunity* 27 (1):11-21.
- Schmid, D., M. Pypaert, and C. Munz. 2007. Antigen-Loading Compartments for Major Histocompatibility Complex Class Ii Molecules Continuously Receive Input from Autophagosomes. *Immunity* 26 (1):79-92.
- Schneider, F., and A. Kieser. 2004. A Novel Assay to Quantify Cell Death after Transient Expression of Apoptotic Genes in B- and T-Lymphocytes. *J Immunol Methods* 292 (1-2):165-74.

- Sebzda, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M. F. Bachmann, and P. S. Ohashi. 1999. Selection of the T Cell Repertoire. *Annu Rev Immunol* 17:829-74.
- Sercarz, E. E., and E. Maverakis. 2003. Mhc-Guided Processing: Binding of Large Antigen Fragments. *Nat Rev Immunol* 3 (8):621-9.
- Servenius, B., L. Rask, and P. A. Peterson. 1987. Class II Genes of the Human Major Histocompatibility Complex. The Do Beta Gene Is a Divergent Member of the Class II Beta Gene Family. *J Biol Chem* 262 (18):8759-66.
- Sha, W. C., C. A. Nelson, R. D. Newberry, J. K. Pullen, L. R. Pease, J. H. Russell, and D. Y. Loh. 1990. Positive Selection of Transgenic Receptor-Bearing Thymocytes by Kb Antigen Is Altered by Kb Mutations That Involve Peptide Binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (16):6186-90.
- Shastri, N., S. Schwab, and T. Serwold. 2002. Producing Nature's Gene-Chips: The Generation of Peptides for Display by Mhc Class I Molecules. *Annu Rev Immunol* 20:463-93.
- Sherman, L. A., and S. Chattopadhyay. 1993. The Molecular Basis of Allorecognition. *Annu Rev Immunol* 11:385-402.
- Sherman, M. A., D. A. Weber, and P. E. Jensen. 1995. Dm Enhances Peptide Binding to Class II Mhc by Release of Invariant Chain-Derived Peptide. *Immunity* 3 (2):197-205.
- Shi, G. P., J. A. Villadangos, G. Dranoff, C. Small, L. Gu, K. J. Haley, R. Riese, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1999. Cathepsin S Required for Normal Mhc Class II Peptide Loading and Germinal Center Development. *Immunity* 10 (2):197-206.
- Shirwan, H., A. Mhoyan, E. S. Yolcu, X. Que, and S. Ibrahim. 2003. Chronic Cardiac Allograft Rejection in a Rat Model Disparate for One Single Class I Mhc Molecule Is Associated with Indirect Recognition by Cd4(+) T Cells. *Transpl Immunol* 11 (2):179-85.
- Siggs, O. M., L. E. Makaroff, and A. Liston. 2006. The Why and How of Thymocyte Negative Selection. *Curr Opin Immunol* 18 (2):175-83.
- Sijts, A. J., and E. G. Pamer. 1997. Enhanced Intracellular Dissociation of Major Histocompatibility Complex Class I-Associated Peptides: A Mechanism for Optimizing the Spectrum of Cell Surface-Presented Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes. *J Exp Med* 185 (8):1403-11.
- Sloan-Lancaster, J., A. S. Shaw, J. B. Rothbard, and P. M. Allen. 1994. Partial T Cell Signaling: Altered Phospho-Zeta and Lack of Zap70 Recruitment in Apl-Induced T Cell Anergy. *Cell* 79 (5):913-22.
- Sloan, V. S., P. Cameron, G. Porter, M. Gammon, M. Amaya, E. Mellins, and D. M. Zaller. 1995. Mediation by Hla-Dm of Dissociation of Peptides from Hla-Dr. *Nature* 375 (6534):802-6.
- Smith, Edward S., Alvin K. Li, Alice M. Wang, David H. Gelfand, and Thomas W. Myers. 2006. Amplification of Rna: High-Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-Activated Thermostable DNA Polymerase. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Smith, P. A., A. Brunmark, M. R. Jackson, and T. A. Potter. 1997. Peptide-Independent Recognition by Alloreactive Cytotoxic T Lymphocytes (CtL). *J Exp Med* 185 (6):1023-33.
- Smyth, L. A., O. Williams, R. D. Huby, T. Norton, O. Acuto, S. C. Ley, and D. Kioussis. 1998. Altered Peptide Ligands Induce Quantitatively but Not Qualitatively

- Different Intracellular Signals in Primary Thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (14):8193-8.
- Sommers, C. L., J. Lee, K. L. Steiner, J. M. Gurson, C. L. Depersis, D. El-Khoury, C. L. Fuller, E. W. Shores, P. E. Love, and L. E. Samelson. 2005. Mutation of the Phospholipase C-Gamma1-Binding Site of Lat Affects Both Positive and Negative Thymocyte Selection. *J Exp Med* 201 (7):1125-34.
- Spain, L. M., J. L. Jorgensen, M. M. Davis, and L. J. Berg. 1994. A Peptide Antigen Antagonist Prevents the Differentiation of T Cell Receptor Transgenic Thymocytes. *J Immunol* 152 (4):1709-17.
- Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and Negative Selection of T Cells. *Annu Rev Immunol* 21:139-76.
- Stefanski, H. E., D. Mayerova, S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2001. A Low Affinity Tcr Ligand Restores Positive Selection of Cd8+ T Cells in Vivo. *J Immunol* 166 (11):6602-7.
- Steinman, R. M., and K. Inaba. 1999. Myeloid Dendritic Cells. *J Leukoc Biol* 66 (2):205-8.
- Stewart-Jones, G. B., A. J. McMichael, J. I. Bell, D. I. Stuart, and E. Y. Jones. 2003. A Structural Basis for Immunodominant Human T Cell Receptor Recognition. *Nat Immunol* 4 (7):657-63.
- Stoeckle, C., V. Sommandas, E. Adamopoulou, K. Belisle, S. Schiekofer, A. Melms, E. Weber, C. Driessen, B. O. Boehm, E. Tolosa, and T. Burster. 2008. Cathepsin G Is Differentially Expressed in Primary Human Antigen-Presenting Cells. *Cell Immunol*.
- Streisinger, G., Y. Okada, J. Emrich, J. Newton, A. Tsugita, E. Terzaghi, and M. Inouye. 1966. Frameshift Mutations and the Genetic Code. This Paper Is Dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the Occasion of His 66th Birthday. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31:77-84.
- Strominger, J. L., R. E. Humphreys, J. M. McCune, P. Parham, R. Robb, T. Springer, and C. Terhorst. 1976. The Immunoglobulin-Like Structure of Human Histocompatibility Antigens. *Fed Proc* 35 (5):1177-82.
- Suchin, E. J., P. B. Langmuir, E. Palmer, M. H. Sayegh, A. D. Wells, and L. A. Turka. 2001. Quantifying the Frequency of Alloreactive T Cells in Vivo: New Answers to an Old Question. *J Immunol* 166 (2):973-81.
- Swat, W., M. Dessing, H. von Boehmer, and P. Kisielow. 1993. Cd69 Expression During Selection and Maturation of Cd4+8+ Thymocytes. *Eur J Immunol* 23 (3):739-46.
- Sykulev, Y., A. Brunmark, T. J. Tsomides, S. Kageyama, M. Jackson, P. A. Peterson, and H. N. Eisen. 1994. High-Affinity Reactions between Antigen-Specific T-Cell Receptors and Peptides Associated with Allogeneic and Syngeneic Major Histocompatibility Complex Class I Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (24):11487-91.
- Takagi, T., J. Harada, and S. Ishii. 2001. Murine Schnurri-2 Is Required for Positive Selection of Thymocytes. *Nat Immunol* 2 (11):1048-53.
- Tallquist, M. D., and L. R. Pease. 1995. Alloreactive 2c T Cells Recognize a Self Peptide in the Context of the Mutant Kb*3 Molecule. *J Immunol* 155 (5):2419-26.
- Tallquist, M. D., T. J. Yun, and L. R. Pease. 1996. A Single T Cell Receptor Recognizes Structurally Distinct Mhc/Peptide Complexes with High Specificity. *J Exp Med* 184 (3):1017-26.

- Tanaka, Y., S. Sano, E. Nieves, G. De Libero, D. Rosa, R. L. Modlin, M. B. Brenner, B. R. Bloom, and C. T. Morita. 1994. Nonpeptide Ligands for Human Gamma Delta T Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (17):8175-9.
- Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Perarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential Requirements for Survival and Proliferation of Cd8 Naive or Memory T Cells. *Science* 276 (5321):2057-62.
- Thien, C. B., F. D. Blystad, Y. Zhan, A. M. Lew, V. Voigt, C. E. Andoniou, and W. Y. Langdon. 2005. Loss of C-Cbl Ring Finger Function Results in High-Intensity Tcr Signaling and Thymic Deletion. *EMBO J* 24 (21):3807-19.
- Tonegawa, S. 1983. Somatic Generation of Antibody Diversity. *Nature* 302 (5909):575-81.
- Towatari, T., and N. Katunuma. 1983. Selective Cleavage of Peptide Bonds by Cathepsins L and B from Rat Liver. *J Biochem* 93 (4):1119-28.
- Tran, D. D., C. E. Edgar, K. L. Heckman, S. L. Sutor, C. J. Huntoon, J. van Deursen, D. L. McKean, and R. J. Bram. 2005. Caml Is a P56lck-Interacting Protein That Is Required for Thymocyte Development. *Immunity* 23 (2):139-52.
- Tran, H. T., J. D. Keen, M. Krickler, M. A. Resnick, and D. A. Gordenin. 1997. Hypermutability of Homonucleotide Runs in Mismatch Repair and DNA Polymerase Proofreading Yeast Mutants. *Mol Cell Biol* 17 (5):2859-65.
- Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert, and I. Mellman. 2003. Activation of Lysosomal Function During Dendritic Cell Maturation. *Science* 299 (5611):1400-3.
- Trombetta, E. S., and I. Mellman. 2005. Cell Biology of Antigen Processing in Vitro and in Vivo. *Annu Rev Immunol* 23:975-1028.
- Turner, S. J., P. C. Doherty, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2006. Structural Determinants of T-Cell Receptor Bias in Immunity. *Nat Rev Immunol* 6 (12):883-94.
- Tynan, F. E., S. R. Burrows, A. M. Buckle, C. S. Clements, N. A. Borg, J. J. Miles, T. Beddoe, J. C. Whisstock, M. C. Wilce, S. L. Silins, J. M. Burrows, L. Kjer-Nielsen, L. Kostenko, A. W. Purcell, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2005. T Cell Receptor Recognition of a 'Super-Bulged' Major Histocompatibility Complex Class I-Bound Peptide. *Nat Immunol* 6 (11):1114-22.
- Tynan, F. E., H. H. Reid, L. Kjer-Nielsen, J. J. Miles, M. C. Wilce, L. Kostenko, N. A. Borg, N. A. Williamson, T. Beddoe, A. W. Purcell, S. R. Burrows, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2007. A T Cell Receptor Flattens a Bulged Antigenic Peptide Presented by a Major Histocompatibility Complex Class I Molecule. *Nat Immunol* 8 (3):268-76.
- Udaka, K., T. J. Tsomides, and H. N. Eisen. 1992. A Naturally Occurring Peptide Recognized by Alloreactive Cd8+ Cytotoxic T Lymphocytes in Association with a Class I Mhc Protein. *Cell* 69 (6):989-98.
- Udaka, K., T. J. Tsomides, P. Walden, N. Fukusen, and H. N. Eisen. 1993. A Ubiquitous Protein Is the Source of Naturally Occurring Peptides That Are Recognized by a Cd8+ T-Cell Clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (23):11272-6.
- Ullmann, emerich. 1902. Experimentelle Nierentransplantation. (First Report of an Experimental Kidney Transplantation). *Wien Klin Wochenschr* 15:281-282.

- Ullmann, Emerich. 1902. Officielles Protokoll Der K.K. Gesellschaft Der Ärzte in Wien. (Description of the First Heterotransplantation of a Dog Kidney to a Goat). *Wien Klin Wochenschr* 15:707.
- . 1914. Tissue and Organ Transplantation. *Annals of surgery* 60:195-219.
- Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia. 1995. Serial Triggering of Many T-Cell Receptors by a Few Peptide-Mhc Complexes. *Nature* 375 (6527):148-51.
- van Bleek, G. M., and S. G. Nathenson. 1991. The Structure of the Antigen-Binding Groove of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Determines Specific Selection of Self-Peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (24):11032-6.
- van Ham, M., M. van Lith, B. Lillemeier, E. Tjin, U. Gruneberg, D. Rahman, L. Pastoors, K. van Meijgaarden, C. Roucard, J. Trowsdale, T. Ottenhoff, D. Pappin, and J. Neefjes. 2000. Modulation of the Major Histocompatibility Complex Class II-Associated Peptide Repertoire by Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (Hla)-Do. *J Exp Med* 191 (7):1127-36.
- van Ham, S. M., E. P. Tjin, B. F. Lillemeier, U. Gruneberg, K. E. van Meijgaarden, L. Pastoors, D. Verwoerd, A. Tulp, B. Canas, D. Rahman, T. H. Ottenhoff, D. J. Pappin, J. Trowsdale, and J. Neefjes. 1997. Hla-Do Is a Negative Modulator of Hla-Dm-Mediated Mhc Class II Peptide Loading. *Curr Biol* 7 (12):950-7.
- van Lith, M., M. van Ham, and J. Neefjes. 2002. Novel Polymorphisms in Hla-Doa and Hla-Dob in B-Cell Malignancies. *Immunogenetics* 54 (8):591-5.
- van Noort, J. M., and M. J. Jacobs. 1994. Cathepsin D, but Not Cathepsin B, Releases T Cell Stimulatory Fragments from Lysozyme That Are Functional in the Context of Multiple Murine Class II Mhc Molecules. *Eur J Immunol* 24 (9):2175-80.
- Viguera, E., D. Canceill, and S. D. Ehrlich. 2001. Replication Slippage Involves DNA Polymerase Pausing and Dissociation. *EMBO J* 20 (10):2587-95.
- Villarreal, X. C., and G. L. Long. 1991. A General Method of Polymerase-Chain-Reaction-Enabled Protein Domain Mutagenesis: Construction of a Human Protein S-Osteonectin Gene. *Anal Biochem* 197 (2):362-7.
- Viret, C., and C. A. Janeway, Jr. 1999. Mhc and T Cell Development. *Rev Immunogenet* 1 (1):91-104.
- von Boehmer, H., I. Aifantis, F. Gounari, O. Azogui, L. Haughn, I. Apostolou, E. Jaeckel, F. Grassi, and L. Klein. 2003. Thymic Selection Revisited: How Essential Is It? *Immunol Rev* 191:62-78.
- von Boehmer, H., and H. J. Fehling. 1997. Structure and Function of the Pre-T Cell Receptor. *Annu Rev Immunol* 15:433-52.
- Vyas, J. M., A. G. Van der Veen, and H. L. Ploegh. 2008. The Known Unknowns of Antigen Processing and Presentation. *Nat Rev Immunol* 8 (8):607-18.
- Wang, J. H., and E. L. Reinherz. 2002. Structural Basis of T Cell Recognition of Peptides Bound to Mhc Molecules. *Mol Immunol* 38 (14):1039-49.
- Wang, J., K. Lim, A. Smolyar, M. Teng, J. Liu, A. G. Tse, R. E. Hussey, Y. Chishti, C. T. Thomson, R. M. Sweet, S. G. Nathenson, H. C. Chang, J. C. Sacchettini, and 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 (1):10-26.

- Watts, C., S. P. Matthews, D. Mazzeo, B. Manoury, and C. X. Moss. 2005. Asparaginyl Endopeptidase: Case History of a Class II Mhc Compartment Protease. *Immunol Rev* 207:218-28.
- Weber, D. A., N. K. Terrell, Y. Zhang, G. Strindberg, J. Martin, A. Rudensky, and N. S. Braunstein. 1995. Requirement for Peptide in Alloreactive Cd4+ T Cell Recognition of Class II Mhc Molecules. *J Immunol* 154 (10):5153-64.
- Webster. 1995. Rootstock and Interstock Effects on Deciduous Fruit Tree Vigour, Precocity, and Yield Productivity. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 23:373-382.
- Werlen, G., B. Hausmann, D. Naehrer, and E. Palmer. 2003. Signaling Life and Death in the Thymus: Timing Is Everything. *Science* 299 (5614):1859-63.
- Wettstein, D. A., J. J. Boniface, P. A. Reay, H. Schild, and M. M. Davis. 1991. Expression of a Class II Major Histocompatibility Complex (Mhc) Heterodimer in a Lipid-Linked Form with Enhanced Peptide/Soluble Mhc Complex Formation at Low pH. *J Exp Med* 174 (1):219-28.
- Whitelegg, A. M., L. E. Oosten, S. Jordan, M. Kester, A. G. van Halteren, J. A. Madrigal, E. Goulmy, and L. D. Barber. 2005. Investigation of Peptide Involvement in T Cell Allorecognition Using Recombinant Hla Class I Multimers. *J Immunol* 175 (3):1706-14.
- Willcox, B. E., G. F. Gao, J. R. Wyer, J. E. Ladbury, J. I. Bell, B. K. Jakobsen, and P. A. van der Merwe. 1999. Tcr Binding to Peptide-Mhc Stabilizes a Flexible Recognition Interface. *Immunity* 10 (3):357-65.
- Williams, O., Y. Tanaka, M. Bix, M. Murdjeva, D. R. Littman, and D. Kioussis. 1996. Inhibition of Thymocyte Negative Selection by T Cell Receptor Antagonist Peptides. *Eur J Immunol* 26 (3):532-8.
- Wilson, D. B., and J. I. Nowell. 1968. Quantitative Studies on the Mixed Lymphocyte Interaction in Rats. 3. Kinetics of the Response. *J Exp Med* 128 (5):1157-81.
- Wucherpfennig, K. W., P. M. Allen, F. Celada, I. R. Cohen, R. De Boer, K. C. Garcia, B. Goldstein, R. Greenspan, D. Hafler, P. Hodgkin, E. S. Huseby, D. C. Krakauer, D. Nemazee, A. S. Perelson, C. Pinilla, R. K. Strong, and E. E. Sercarz. 2007. Polyspecificity of T Cell and B Cell Receptor Recognition. *Semin Immunol* 19 (4):216-24.
- Wucherpfennig, K. W., and J. L. Strominger. 1995. Molecular Mimicry in T Cell-Mediated Autoimmunity: Viral Peptides Activate Human T Cell Clones Specific for Myelin Basic Protein. *Cell* 80 (5):695-705.
- Wurch, T., F. Lestienne, and P. J. Pauwels. 1998. A Modified Overlap Extension Pcr Method to Create Chimeric Genes in the Absence of Restriction Enzymes. *Biotechnology Techniques* 12 (9):653-657.
- Xu, Y., C. Jagannath, X. D. Liu, A. Sharafkhaneh, K. E. Kolodziejska, and N. T. Eissa. 2007. Toll-Like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity. *Immunity* 27 (1):135-44.
- Yamada, A., T. M. Laufer, A. J. Gerth, C. M. Chase, R. B. Colvin, P. S. Russell, M. H. Sayegh, and H. Auchincloss, Jr. 2003. Further Analysis of the T-Cell Subsets and Pathways of Murine Cardiac Allograft Rejection. *Am J Transplant* 3 (1):23-7.

- Yamada, M., H. Izu, T. Nitta, K. Kurihara, and T. Sakurai. 1998. High-Temperature, Nonradioactive Primer Extension Assay for Determination of a Transcription-Initiation Site. *Biotechniques* 25 (1):72-4, 76, 78.
- York, I. A., and K. L. Rock. 1996. Antigen Processing and Presentation by the Class I Major Histocompatibility Complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-96.
- Yoshikawa, T., S. Imazu, J. Q. Gao, K. Hayashi, Y. Tsuda, N. Okada, Y. Tsutsumi, M. Akashi, T. Mayumi, and S. Nakagawa. 2006. Non-Methylated CpG Motif Packaged into Fusogenic Liposomes Enhance Antigen-Specific Immunity in Mice. *Biol Pharm Bull* 29 (1):105-9.
- Zavasnik-Bergant, T., and B. Turk. 2006. Cysteine Cathepsins in the Immune Response. *Tissue Antigens* 67 (5):349-55.
- Zavasnik-Bergant, V., A. Schweiger, T. Bevec, R. Golouh, V. Turk, and J. Kos. 2004. Inhibitory P41 Isoform of Invariant Chain and Its Potential Target Enzymes Cathepsins L and H in Distinct Populations of Macrophages in Human Lymph Nodes. *Immunology* 112 (3):378-85.
- Zerrahn, J., W. Held, and D. H. Raulet. 1997. The Mhc Reactivity of the T Cell Repertoire Prior to Positive and Negative Selection. *Cell* 88 (5):627-36.
- Zhang, Y. J., H. Y. Pan, and S. J. Gao. 2001. Reverse Transcription Slippage over the Mrna Secondary Structure of the Lip1 Gene. *Biotechniques* 31 (6):1286, 1288, 1290, passim.
- Zhu, J., and W. E. Paul. 2008. Cd4 T Cells: Fates, Functions, and Faults. *Blood* 112 (5):1557-69.
- Zinkernagel, R. M., and P. C. Doherty. 1974. Restriction of in Vitro T Cell-Mediated Cytotoxicity in Lymphocytic Choriomeningitis within a Syngeneic or Semiallogeneic System. *Nature* 248 (450):701-2.

