UNIVERSITÉ DE NANTES Faculté de Médecine

ÉCOLE DOCTORALE • BIOLOGIE - SANTÉ

Année 2011

## Antigénicité des complexes peptide/CMH

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Immunologie

*Présentée et soutenue publiquement par* 

### **François LEGOUX**

Le 16 février 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : M. Philippe BOUSSO, Directeur de Recherche, Paris M. Matthew ALBERT, Directeur de Recherche, Paris Examinateurs : M. Marc BONNEVILLE, Directeur de Recherche, Nantes M. Xavier SAULQUIN, Maître de Conférences, Nantes

Directeurs de thèse

M. Marc BONNEVILLE, Directeur de Recherche, Nantes M. Xavier SAULQUIN, Maître de Conférences, Nantes

## SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
I Table des illustrations	4
II Liste des abréviations	<i>+</i> 7
INTRODUCTION	8
AVANT DOODS	0
I Formation du vénertoire T	
1. 1 of multion du reperioire 1	10
1. Organisation des loci	10
2. Réarrangements des gènes du TCR	10
3. Sources de diversité du répertoire des TCR	
B. Développement thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$	
1. Régulation de l'assemblage des gènes du TCR	
2. Exclusion allélique du TCR	
3. Sélection thymique	19
4. Choix de lignage CD4/CD8	30
II. Activation du lymphocyte T et rôle des corécepteurs	34
A. Aspects cinétiques de l'interaction TCR - pCMH	34
B. Association du complexe TCR-CD3	34
C. Les corécepteurs CD4 et CD8	
D. Rôle des corecepteurs CD4 et CD8 dans l'activation de la cellule 1	
III. Aspects structuraux de l'interaction TCR-pCMH	40
A. Structure du complexe pUMH	
<ul> <li>B. Structure du TCKαp en complexe avec son figand</li> <li>C. Diversité des complexes pCMU et pécessoire gracgrégativité du TCP.</li> </ul>	
D. Bases structurales de la crossréactivité des TCP	
1 Elevibilité conformationnelle des CDR3	
2. Mimétisme structural	
E. Bases structurales des sélections thymiques	
F. Bases structurales de l'alloréactivité	47
G. Bases structurales des biais de répertoires T Ag-spécifiques	
1. Biais du répertoire T MP/A2-spécifique	49
2. Biais du répertoire T MelA/A2 spécifique	
3. Modèle structural de l'antigénicité d'un complexe pCMH	51
IV. Objectifs poursuivis et contexte scientifique de l'étude	53
RESULTATS	55
I. Principaux outils expérimentaux	56
A. Monomères de complexes peptide/CMH recombinants	
B. Tétramères et multimères de complexes peptide/CMH	57
C. Mutants	57
D. Technique d'enrichissement immunomagnétique pour la détection et quantification de populations	-
lymphocytaires rares	
1. Specificité du marquage par les oligomères de complexes pCMH	60
2. Qualité des estimations de frequences des cellules 1 farés et seuil de detection	
II. Article 1. Impact of TCK reactivity and HLA phenotype on naive CD8 T cell frequency in numan.	s05
III. Antigenicite des complexes pCMH dans le reperioire 1 non selectionne	70
A. Objectils poursuivis P. Máthadalagia	
D. McMoulogic C. Détection de thymocytes nA2-snécifiques dans les différents compartiments thymiques	
1 Les biais moléculaires des rénertoires T Ag-snécifiques dans le thymus	
2. Les populations T CD8 <sup>+</sup> Ag-spécifiques ne sont pas remodelées en périphérie	
3. Les populations CD4 <sup>+</sup> pA2-spécifiques subissent une contraction en périphérie	
4. Les thymocytes DP constituent un répertoire de TCR non sélectionné	
D. Remodelages quantitatifs du répertoire T par les sélections thymiques	
1. Réactivité inhérente du répertoire pré-sélectionné vis-à-vis du CMH	
2. Impact des sélections thymiques sur la réactivité du répertoire T	90
E. Remodelage qualitatif du répertoire T par les sélections thymiques	
F. CONCIUSIONS	96

IV. Rôle de l'expression du bon corécepteur dans l'activation fonctionnelle des lymphocytes T	98
A. Objectifs poursuivis	98
B. Obtention de populations T polyclonales CD4 <sup>+</sup> pCMH I-spécifiques	98
C. Analyse fonctionnelle comparative des populations T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> dirigées contre le même Ag	101
1. Les cellules CD4 <sup>+</sup> répondent moins fortement à l'Ag que leurs homologues CD8 <sup>+</sup>	101
2. Les cellules T CD4 <sup>+</sup> présentent une forte avidité pour les complexes pCMHI	103
3. Contribution du corécepteur CD8 dans l'interaction TCR-pCMH et dans l'activation fonctionnelle du	104
lymphocyte	104
D. L'avidite des cellules CD4 pour le pCMH I determine leur activation fonctionnelle	107
E. Quelle relevance physiologique des cellules CD4 CMH 1-restreintes ?	109
V. Article 2 : What structural basis for pMHC antigenicity ?	112
DISCUSSION	135
I Déterminants de l'antigénicité des complexes nCMH de classe I	136
A Les complexes pCMH I sont inégalement antigéniques dans le rénertoire T CD8 <sup>+</sup> noif	130
A. Les omplexes per un sont meganinent angeinqués dans le repetitor le CD6 nations de la solution de la constitution de la con	137
C. L'antigénicité d'un complexe nCMH est gouvernée par sa topologie globale	138
D. Les sélections thymiques ont pour effet d'accentuer les différences d'antigénicités liées aux topologies des complexes pCMH	3 3 139
E. Les complexes pCMH peu antigéniques sont immunogènes chez l'homme, et sont reconnus par des TCR crossréactifs	140
II. Limitations de l'étude	142
A. Limites d'une étude quantitative	142
B. Nécessité d'élargir l'étude à d'autres complexes antigéniques	142
C. Limites du modèle humain	143
III. Perspectives	144
A. Bases moléculaires du docking conservé du TCR sur son ligand	144
B. Bases moléculaires de la peptide-spécificité du TCR	144
C. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes B pCMH I-spécifiques	145
D. Suivi de réponses T allo-spécifiques chez des receveurs allo-transplantés rénaux.	145
BIBLIOGRAPHIE	147
ANNEXES	168
I Anticle 2. Structural bases for the affinity driver selection of a multic TCD regiment a deminant how	
1. Article 5 : Structural bases for the affinity-artiven selection of a public TCR against a dominant num	nan
cytomegaiovirus epitope.	109 W
II. Article 4 : Crystallization and preliminary X-ray crystallographic characterization of a public CM	!V-
specific TCR in complex with its cognate Ag	179
III. Article 5 : Sphingosine-1-Phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis.	185

## I. TABLE DES ILLUSTRATIONS

#### FIGURES

Figure 1 : Organisation génomique des loci $\alpha$ et $\beta$ du TCR humain (Bonneville et Saulquin, 2005)	11
Figure 2 : Représentation schématique des réarrangements des loci $\alpha$ et $\beta$ du TCR	12
Figure 3 : Organisation schématique d'un SSR	13
Figure 4 : Différentiation intrathymique des cellules T (Bonneville et Saulquin, 2005).	16
Figure 5: Localisation intrathymique des thymocytes en maturation (Klein et al., 2009).	17
Figure 6 : Devenirs des thymocytes DP selon le modèle de sélection basé sur l'avidité des interactions TCR-	
pCMH (Palmer, 2003)	20
<i>Figure 7 : Le modèle d'avidité de l'interaction TCR-pCMH pour la sélection des thymocytes DP (Klein et al., 2009)</i>	21
Figure 8 : Mécanismes de génération des complexes pCMH de classes I et II par les cTEC (Klein et al., 2009) Figure 9 : Représentation schématique des unités 20S des protéasomes impliqués dans les mécanismes immunitaires (Klein et al. 2009)	24
Figure 10: Expression ectonique d'antigènes tissulaires (TRA) par les mTEC (Kvewski et Derhinski 2004)	28
Figure 11: Schéma du dévelopment des lymphocytes T dans le thymus suivant l'expression de surface des	0
corécepteurs CD4 et CD8, selon le modèle cinétique de choix de lignage CD4/CD8	33
Figure 12 · Le complexe TCR-CD3 (Schumacher, 2002)	3.5
Figure 12 : De complexe l'en CDS (Schumdelei, 2002)	et
Wuchernfennig, 2004)	36
Figure 14: Modèle classique de l'activation du lymphocyte Τ αβ via ses TCR et corécepteur (Gascoigne, 2008	8)
	37
Figure 15: Le modèle du pseudo-dimère (Gascoigne 2008)	39
Figure 16: De mouele au pseudo annele (Gasselgne, 2000). Figure 16: Organisation des domaines des molécules de CMH I et II (panel du haut), et site de fixation du	
neptide (panel du bas) (Rudolph et al., 2006).	40
Figure 17: Conformations de peptides présentés par les CMH I (en haut) et les CMH II (en bas) (Rudolph et a 2006)	ıl., 42
Figure 18: Structure du TCRaß en complexe avec son ligand (Gras et al. 2009)	43
Figure 10: Nécessaire crossréactivité des TCR	44
Figure 20: Reconnaissance par le TCR de complexes pCMH conventionnels ou allogéniques (Felix et Allen,	
2007)	. 48
Figure 21: Structure de l'interaction TCR-MP/A2 (Gras et al., 2008).	. 49
Figure 22 (Cole et al., 2009): Structure de l'interaction TCR-MelA/A2.	. 50
Figure 23: Bases structurales de la diversite d'un repertoire 1 pCMH-specifique (D'apres (Turner et al., 2000	5) 52
Figure 24: Schéma de la stratégie de production d'oligomères fluorescents de complexes pCMH	57
Figure 25: Stratégie d'enrichissement immunomagnétique et d'analyse phénotypique ex vivo des cellules marauées par un oligomère de pCMH fluorescent.	59
Figure 26: Stratégie de fenêtrage des événements acquis après un enrichissement en cellules $MelA/A2^+$ réalise	é
sur $10^8$ PBMC frais.	59
Figure 27: Exemples d'enrichissements en lymphocytes T spécifiques de différents épitopes immunodominants	s et
A2-restretitis.	61
Figure 20. Doubles enficiessements en centules pCMIT-specifiques.	. 01
oligomères Mal 1/42 et MP/42 respectivement	61
Figure 30: Analyse fonctionnelle d'une lignée T CD8 <sup>+</sup> triée par le multimère Mel4/42	62
Figure 31: Estimation de la fréquence résiduelle après déplétion en cellules oligomères <sup>+</sup>	63
Figure 32: Sensibilité et efficacité de l'enrichissement immunomagnétique	63
Figure 32: Sensionne et efficience de l'entenssement innunomignetique.	05
immunomagnétique chez des donneurs 42 <sup>+</sup> séronositifs nour le VHC le HCMV ou le virus de l'influenza	64
Figure 34. Stratégie de fenêtrage nour la détection de thumocutes multimère <sup>+</sup>	77
Figure 35: Détection de thymocytes multimère+ au sein de chacun des trois compartiments thymiques d'un	. / /
1.5 and $50.5$ detection we my model to small interval with some we chack and $10.5$ compartiments in y miques a un donneur $A2^+$	78
Figure 36: Détection de thymocytes multimère <sup>+</sup> au sein de chacun des trois compartiments thymiques d'un	,0
donneur A2 <sup>7</sup> .	79
Figure 37: Biais moléculaires des répertoires thymiques MelA/A2 et MP/A2-spécifiques.	81
Figure 38: Usage préférentiel du segment génique AV2 par les populations thymiaues (panel du haut) et	
périphériques (panel du bas) dirigées contre PGT/A2.	81

Figure 39: Les populations T CD8 <sup>+</sup> Ag-spécifiques ne sont pas remodelées en périphérie.	82
Figure 40: Les populations CD4 <sup>+</sup> pA2-spécifiques subissent une contraction en périphérie.	84
Figure 41: Les thymocytes DP constituent un répertoire de TCR non sélectionné.	85
Figure 42: Détection de lymphocytes B pCMH-spécifiques.	87
Figure 43: Fréquences de lymphocytes B naïfs spécifiques des complexes pCMH I.	87
Figure 44: Fréquences des thymocytes multimère <sup>+</sup> dans les compartiments DP (en rouge ou en vert), SP8 (en	ı
noir) et SP4 (en blanc), chez des individus $A2^+$ (panel du haut) ou $A2^-$ (panel du bas).	89
Figure 45: Répartition des populations thymiques spécifiques de MelA/A2, NS3/A2 et Gag/A2 au sein des	
compartiments DP, SP8 ou SP4.	90
Figure 46: Taux d'enrichissement en cellules Ag-spécifiques entre le compartiment DP et le compartiment SI	P8
chez neuf donneurs $A2^+$ (en rouge) et neuf donneurs $A2^-$ (en vert).	91
Figure 47: Pourcentages de cellules T exprimant le segment de TCR AV2, indépendamment de leur spécificit	é
antigénique et de leur haplotype HLA, dans les compartiments DP, CD8 <sup>+</sup> et CD4 <sup>+</sup> .	_ 92
Figure 48: Impact qualitatif de l'expression de l'allèle de restriction.	_ 94
Figure 49: Fréquences des cellules T CD4 <sup>+</sup> naïves pA2-spécifiques au sein de PBMC de donneurs sains,	
indépendamment de l'expression du HLA-A2 (Legoux et al., 2010)	_ 99
Figure 50: Caractérisation des populations T CD8 <sup>+</sup> et CD4 <sup>+</sup> pCMH I-spécifiques.	100
Figure 51: Différences de sensibilité à l'Ag des populations $CD4^+$ (en vert) et $CD8^+$ issues de donneurs $A2^+$ (	(en
rouge) ou A2 <sup>-</sup> (en orange) pCMH I-spécifiques.	102
Figure 52: Courbes de dissociation des tétramères WT MelA/A2 et NS3/A2 en présence de multimères WT de	?
même spécificité.	104
Figure 53: Contribution du corécepteur CD8 dans l'interaction TCR-pCMH et dans l'activation fonctionnell	е
du lymphocyte	106
Figure 54: L'avidité des clones CD4 <sup>+</sup> pour le multimère de pCMH détermine leur activation fonctionnelle.	108
Figure 55: Classement des populations T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> étudiées selon l'affinité de leur TCR.	109
Figure 56: Fréquences de lymphocytes T naïfs spécifiques de différents complexes pA2 au sein des PBMC de	
donneurs A2 <sup>+</sup> sains (Legoux et al., 2010)	110
Figure 57: Amplification et phénotype mémoire de la composante CD4 <sup>+</sup> pp65/A2-spécifique chez un donneur	~
A2 <sup>+</sup> HCMV-séropositif	110
Figure 58: Les cellules T CD4 <sup>+</sup> sont activées par des lignées de mélanomes.	111
Figure 59: Profils cytokiniques des populations T CD4 et CD8 pCMHI-spécifiques.	111

### TABLEAUX

Tableau 1 : Polymorphisme des allèles du CMH de classe I et II.	41
Tableau 2 : épitopes A2-restreints inclus dans l'étude.	65
Tableau 3 : Populations T Ag-spécifiques obtenues par enrichissement immunomagnétique couplé à un tri par	~
cytométrie en flux.	99

### **II. LISTE DES ABRÉVIATIONS**

Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	antigène
AIRE	autoimmune regulator
APC	allophycocyanine
ARN	acide ribonucléique
β2m	β-2-microglobuline
CCR	C-C motif chemokine receptor
CD8	cluster of differenciation 8
CDR	complementary determining region
СМН	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice de l'antigène
DC	cellule dendritique
DP	double positif
DN	double négatif
FACS	fluorescence associated cell sorting
GvH	graft versus host disease
HCMV	human cytomegalovirus
HLA	human leucocyte antigen
ICAM	inter-cellular adhesion molecule
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LCK	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
pb	paire de base
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
рСМН	complexe peptide/CMH
PD-1	programmed death 1
PE	phycoérythrine
PRR	pathogen recognition receptor
RAG	recombination activating gene
SP	simple positif
SSR	séquence signale de recombinaison
TAP	transporter of antigen presentation
TCR	T cell receptor
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TEC	thymic epithelial cell
TNF	tumor necrosis factor
TRA	tissu restricted antigen
TREC	T cell receptor excision circle
<b>TSSP</b>	1
1001	thymus-specific serine protease
VHC	thymus-specific serine protease virus de l'hépatite C

## INTRODUCTION

#### **AVANT-PROPOS**

L'immunogénicité d'un antigène (Ag), définie comme sa capacité à induire une réponse immunitaire, est gouvernée de façon complexe par de multiples paramètres. En particulier, au-delà de l'impact de sa dose, de sa voie d'administration et de son potentiel à être apprêté et associé à une molécule du CMH du soi, l'Ag doit être capable d'interagir avec les récepteurs à l'Ag des cellules T (ou TCR). Cette dernière propriété, définie comme l'antigénicité d'un Ag, a fait l'objet de ce travail de thèse.

Nous avons exploité une technique d'enrichissement immunomagnétique des cellules capables d'interagir avec des complexes peptide/CMH (pCMH) recombinants pour déterminer *ex vivo* leur degré d'antigénicité dans le répertoire T avant ou après les sélections thymiques sur l'allèle de CMH de restriction ou sur des allèles non apparentés. L'antigénicité de ces complexes pCMH recombinants a également été évaluée au sein du répertoire B, qui diffère du répertoire T par son mode de reconnaissance CMH-indépendant de l'antigène.

Parce que l'antigénicité d'un complexe pCMH est étroitement liée aux propriétés du répertoire T et à son mode de reconnaissance de l'Ag, nous présenterons en introduction les mécanismes responsables de la formation et de la maturation intrathymique du répertoire de TCR, et nous décrirons les caractéristiques structurales de l'interaction TCR-pCMH. Dans un second temps, nous présenterons les outils expérimentaux utilisés et les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. Enfin, nous discuterons des résultats, de leurs limites et des perspectives qu'ils proposent.

Les lymphocytes T constituent les effecteurs centraux de l'immunité cellulaire anti-virale ou anti-tumorale. Leurs fonctions effectrices sont activées après interaction entre leurs récepteurs à l'antigène (appelés TCR pour T Cell Receptor) et des complexes formés par des antigènes (Ag) oligopeptidiques présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules cibles. La région variable des chaînes du TCR, qui permet la reconnaissance spécifique des Ag, est codée par des segments géniques séparés sur le chromosome qui sont réarrangés de manière somatique lors du développement lymphoïde. Ce processus de réarrangement permet la génération de myriades de récepteurs différents. La diversité du TCR vient à la fois de l'assemblage combinatoire des segments géniques variable (V), diversité (D) et jonction (J) pris parmi un répertoire d'éléments distincts, et de modifications de séquence lors de ces réarrangements effectuées par la machinerie de recombinaison. Dans cette partie, nous allons détailler les différents mécanismes de réarrangement et de formation du TCR, ainsi que les mécanismes de sélection et de choix de lignage qui conduisent à la génération du répertoire des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> périphériques.

#### A. Organisation génomique et origine de la diversité du TCR

#### 1. Organisation des loci

Il existe quatre loci géniques du TCR sur l'ADN germinal, chacun comprenant un grand nombre d'éléments V, J et dans certains cas D distincts. Les éléments V peuvent être groupés en familles qui correspondent par convention à une série de gènes V dont les séquences présentent plus de 75% d'homologie. Les segments géniques V ont deux exons, les segments D et J un seul exon et les segments C trois à cinq exons. La description détaillée des séquences du TCR et des nomenclatures est disponible sur la base de données d'Immunogenetics Database (<u>http://imgt.cines.fr</u>). Nous utiliserons ici la nomenclature d'Arden (Arden et al., 1995). Une représentation schématique de l'organisation des loci  $\alpha$  et  $\beta$ du TCR est proposée dans la figure 1.



Figure 1 : Organisation génomique des loci  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR humain (Bonneville et Saulquin, 2005)

Les segments VDJ sont représentés par des rectangles mauves, les promoteurs par des flèches, les enhancers par des cercles colorés. Les traits colorés indiquent les régions contrôlées par les promoteurs ou enhancers correspondants.

#### 1.1. Le locus $\beta$ du TCR

Le locus  $\beta$  du TCR est situé sur le chromosome 7 chez l'homme et comprend une région d'environ 600 kb. Tous les gènes V $\beta$  sont regroupés dans la même région chromosomique à l'exception du V $\beta$ 20.1, qui est localisé après l'élément C $\beta$ 2 et est orienté en antisens. Il existe 67 éléments V $\beta$ , dont 41 à 47 sont fonctionnels, répartis en 32 familles (Rowen et al., 1996). La partie 3' du locus  $\beta$  provient de la duplication d'une région ancestrale comprenant un élément D $\beta$ , six éléments J $\beta$  et un élément C $\beta$ . Elle est donc constituée de deux D $\beta$ , douze J $\beta$  et deux C $\beta$ . Les deux gènes C $\beta$  diffèrent de seulement quatre aminoacides et semblent fonctionnellement équivalents. Un enhancer  $\beta$ , qui joue un rôle primordial dans le contrôle de la transcription et le réarrangement du locus  $\beta$ , est localisé entre les éléments C $\beta$ 2 et le V $\beta$ 20.1 (Gottschalk et Leiden, 1990).

#### 1.2. Le locus $\alpha/\delta$ du TCR

Le locus  $\alpha/\delta$  du TCR est localisé sur le chromosome 14 chez l'homme et comprend une région d'environ une mégabase. Il contient 45 à 47 segments V $\alpha$  fonctionnels regroupés en 41 familles, 50 J $\alpha$  et un seul C $\alpha$ . Le locus  $\delta$  est localisé à l'intérieur du locus  $\alpha$ , entre les segments V $\alpha$  et J $\alpha$ . Cette position étonnante a des implications importantes puisque tout réarrangement VJ $\alpha$  conduit à la délétion du locus  $\delta$ . Ce mécanisme, combiné à des processus de régulation transcriptionnelle, prévient la coexpression des chaînes  $\alpha$  et  $\delta$  et assure donc une expression exclusive de TCR  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  dans une cellule T donnée. Les règles gouvernant l'usage de l'un des segments géniques V $\alpha$  ou  $\delta$  ne sont pas élucidées à l'heure actuelle.

#### 2. Réarrangements des gènes du TCR

Chaque chaîne du TCR est codée par des segments géniques V(D)J divers séparés sur le chromosome. Au cours du développement des lymphocytes T, ces éléments sont joints pour former une seule séquence, codante pour le domaine variable (ou domaine V) de chaque sousunité de reconnaissance. Le domaine V de la chaîne  $\alpha$  est codé par les éléments V et J, alors que le domaine V de la chaîne  $\beta$  est codé par les éléments V, D et J (Fig. 2). Au sein de chaque domaine V, trois régions hypervariables ou CDR (complementary determining region) ont été identifiées. Les CDR1 et CDR2 sont codés somatiquement par les segments V, tandis que le CDR3 est créé par juxtaposition des segments V(D)J (Fig. 2).



Figure 2 : Représentation schématique des réarrangements des loci  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR (panel du haut), et localisation des CDR sur le domaine V (panel du bas) (Turner et al., 2006).

La recombinaison V(D)J est initiée par la reconnaissance et le clivage de l'ADN à des sites conservés nommés séquences signal de recombinaison (SSR) qui sont accolés aux éléments V, D et J (Tonegawa, 1993). Ces SSR sont chacun constitués d'une séquence palindromique de 7 pb (consensus 5' CACAGTG) et d'une séquence de 9 pb riche en A/T

(consensus 5' ACAAAAACC), séparées par un spacer peu conservé d'une longueur de 12 ou de 23 pb (Fig. 3).





Schéma d'un SSR (en haut) et du réarrangement des segments géniques V(D)J du TCR par reconnaissance des SSR (en bas) (Bonneville et Saulquin, 2005).

La recombinaison entre deux segments géniques ne s'effectue qu'entre un SSR ayant un spacer de 12 pb et un SSR ayant un spacer de 23 bp (Early et al., 1980). La machinerie enzymatique permettant les réarrangements implique les recombinases spécifiques des cellules lymphoïdes RAG1 et RAG2 (Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990) et des enzymes ubiquitaires de réparation de l'ADN (pour revue, voir Grawunder et al., 1998; Fugmann et al., 2000). Le processus de recombinaison est initié par la reconnaissance et la juxtaposition étroite de deux SSR de 12 et 23 pb par les protéines RAG, qui génèrent ensuite une cassure double brin sur l'ADN entre le SSR et la séquence codante V/D/J. Dans une seconde phase de recombinaison impliquant les protéines RAG et de nombreuses enzymes de réparation de l'ADN double brin, les extrémités signal SSR et les extrémités codantes sont jointes respectivement tête-à-tête. Ce processus est imprécis et génère soit des extrémités codantes complètes, soit des délétions à la fin de la partie codante, soit encore l'addition de nucléotides palindromiques dérivés du brin non codant (Lafaille et al., 1989; Lieber, 1991). Les extrémités codantes peuvent également subir un processus exonucléasique qui entraîne un grignotage important des éléments V, D et J. De plus, un nombre variable de nucléotides non germinaux peut être ajouté par la polymérase TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) d'une manière aléatoire aux extrémités codantes (Komori et al., 1993).

À la suite de la ligation tête-à-tête des SSR, la partie d'ADN située entre les segments géniques réarrangés est enlevée sous la forme d'un produit circulaire d'excision (TREC : T cell Receptor Excision Circle). Ces cercles d'ADN de TCR excisé sont trouvés en nombres importants dans les lymphocytes T récemment sortis du thymus, mais leur nombre par cellule décroît au cours des divisions cellulaires du lymphocyte T (Hazenberg et al., 2001). Cet ADN circulaire peut donc être utilisé comme marqueur de l'expansion homéostatique des cellules T.

#### 3. Sources de diversité du répertoire des TCR

Différents mécanismes opèrent lors de l'assemblage des éléments géniques du TCR pour atteindre un degré élevé de diversité des régions variables des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR. De plus, il existe aussi une source de diversité interindividuelle des TCR qui a pour origine le polymorphisme des gènes du TCR. Chez l'homme, on compte de nombreuses variations alléliques pour les segments V $\alpha$  et V $\beta$  (Robinson, 1989; Wright et al., 1991).

#### 3.1. La diversité combinatoire

Elle est déterminée par le nombre de combinaisons aléatoires V(D)J produisant un TCR  $\alpha\beta$ . L'assemblage au hasard des gènes VJ $\alpha$  et VDJ $\beta$  peut générer environ 2500 (50x50) et 1200 (50x2x12) combinaisons possibles respectivement. En tenant compte de l'association au hasard des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , la diversité combinatoire peut produire 3.10<sup>6</sup> TCR différents.

#### 3.2. La diversité jonctionnelle

L'assemblage V(D)J est associé à d'importantes modifications des extrémités codantes des segments réarrangés. Premièrement, le clivage imprécis des extrémités codantes peut entraîner des additions de nucléotides palindromiques ou la délétion de séquences V(D)J. Deuxièmement, des délétions peuvent être effectuées par le processus exonucléasique à un stade plus avancé de la recombinaison. Et troisièmement, l'addition d'un nombre variable de nucléotides non-germinaux peut accroître la diversité jonctionnelle. Ensemble, le clivage imprécis, l'activité exonucléolytique et l'addition de nucléotides génèrent une diversité énorme au niveau des jonctions V(D)J, qui constituent les CDR3. Considérant que jusqu'à six nucléotides peuvent être ajoutés à chaque jonction, le nombre théorique de séquences jonctionnelles différentes possibles atteint un ordre de  $10^7$  à  $10^{11}$ .

#### 3.3. Les facteurs restreignant la diversité du TCR

Les effets additionnés des processus de diversification combinatoire et jonctionnelle permettent théoriquement la production de  $10^{16}$  TCR distincts chez un individu donné. Cependant, le sang périphérique ne totalise pas plus de  $10^{12}$  cellules T, contenant 25 à  $100.10^{6}$  clonotypes distincts d'après une estimation basée sur l'amplification et le séquençage des gènes du TCR (Arstila et al., 1999). Cette restriction dans la diversité du répertoire T peut être due à plusieurs facteurs :

- L'assemblage des segments V(D)J ne s'effectue pas totalement au hasard, tous les éléments géniques n'ayant pas en effet une accessibilité équivalente à la machinerie de recombinaison à un temps donné. Par exemple, les segments Jβ2.x sont plus fréquemment réarrangés que les segments Jβ1.x (Candéias et al., 1991), ou encore, les éléments V les plus en aval et J en amont tendent à être réarrangés en premier durant l'ontogenèse (Pasqual et al., 2002), reflétant probablement une « ouverture » progressive du locus du TCR sous le contrôle des éléments proximaux.
- De nombreuses recombinaisons V(D)J différentes peuvent "converger" pour produire la même séquence nucléotidique, et de nombreuses séquences nucléotidiques peuvent "converger" pour donner la même séquence protéique (Venturi et al., 2008).
- Les différents nucléotides non-germinaux ne sont pas incorporés avec la même efficacité, les nucléotides G et C étant surreprésentés.

#### B. Développement thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$

#### 1. Régulation de l'assemblage des gènes du TCR

Les cellules T progénitrices, qui n'expriment ni les corécepteurs CD4 et CD8, ni les protéines RAG, migrent de la moelle osseuse vers le thymus. Leurs maturation et différentiation en thymocytes matures peuvent être divisées en différents stades, suivant leur profil phénotypique, leur localisation intrathymique et le stade de réarrangement du locus de leur TCR (Fig. 4 et 5).



#### Figure 4 : Différentiation intrathymique des cellules T (Bonneville et Saulquin, 2005).

Les stades de différentiation sont définis par l'expression de marqueurs de différentiations (CD44, CD25), des corécepteurs (CD4, CD8), et du pré-TCR ou du TCR. L'expression des recombinases et des réarrangements V(D)J en cours sont représentés par des bandes rouges et bleues, respectivement.





Les cellules T progénitrices entrent dans le thymus à proximité de la jonction cortico-médullaire (stade DN I), puis migrent vers l'épithélium sub-capsulaire en uprégulant CD25 (stade DN II) puis en downrégulant CD44 (DN III). À ce stade se déroulent les réarrangements du TCR $\beta$ , et l'association avec la chaîne pT $\alpha$  entraîne le passage au stade DN IV (non représenté). Si le thymocyte réussit la sélection  $\beta$ , il prolifère intensément et exprime les corécepteurs CD4 et CD8 (stade DP). Tout en réarrangeant le locus du TCR $\alpha$ , les thymocytes DP se déplacent dans le cortex et scannent les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) à la recherche de ligands de sélection positive. Après la sélection positive et le choix de lignage CD4/CD8, les thymocytes simples positifs (SP, CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) migrent vers la médulla où ils scannent les cellules présentatrices de l'Ag (CPA) médullaires (essentiellement les cellules épithéliales thymiques médullaires ou mTEC et les cellules dendritiques ou DC) à la recherche de ligands de sélection négative. Après 4 ou 5 jours dans la médulla, les thymocytes survivant à la sélection négative quittent le thymus pour la périphérie.

Les précurseurs précoces doubles négatifs (DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) sont divisés en quatre groupes suivant l'expression des marqueurs de différentiation CD25 et CD44. L'expression des protéines RAG1 et RAG2 est initiée au stade DN I, lorsque les thymocytes immatures entrent dans le thymus à proximité de la jonction cortico-médullaire (Wilson et al., 1994). Le réarrangement partiel des éléments DJβ s'effectue durant les stades DN II et DN III (Tourigny et al., 1997) et les réarrangements VDJβ sont complétés au stade DN IV. Les réarrangements VDJß productifs conduisent à la production d'une chaîne ß, qui s'associe de manière covalente à la protéine pTa pour former un « pré-TCR » (Saint-Ruf et al., 1994). pTa est codée par un gène non réarrangé dont l'expression est activée transitoirement durant le développement des lymphocytes T. Comme le TCR, le pré-TCR est associé au complexe CD3 qui permet la transduction du signal. L'activation du thymocytes immature par le complexe CD3/pré-TCR induit une prolifération massive et transitoire, une perte du CD25 et l'acquisition des marqueurs CD4, CD8, CD2, CD5 et CD69 (Levelt et Eichmann, 1995). Cette activation par le pré-TCR, indépendante de la présence d'un ligand spécifique (Yamasaki et al., 2006) et aussi appelée sélection  $\beta$ , représente un point clef qui permet l'expansion sélective et la maturation ultérieure des précurseurs de lymphocytes T qui ont une chaîne  $\beta$  fonctionnelle, et ce sans introduire de biais dans l'usage des segments géniques Vβ (Aifantis et al., 1997; Wilson et al., 2001). Durant cette phase de prolifération induite par le pré-TCR, l'activité des recombinases RAG est réduite (Lin et Desiderio, 1994). La réexpression de RAG et l'ouverture des loci  $\alpha$  du TCR permettent le réarrangement VJ $\alpha$  et l'expression d'un TCR $\alpha\beta$ , au stade double positif (DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (Fig. 4). C'est à ce stade que, sur la base de la spécificité du TCR exprimé, vont s'effectuer les sélections thymiques positives et négatives, ainsi que le choix du lignage CD4 ou CD8 par le thymocyte en maturation. À l'issue des sélections thymiques, les thymocytes matures simples positifs CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> migrent vers la périphérie sans connaître de nouvelle phase proliférative (Weinreich et Hogquist, 2008).

#### 2. Exclusion allélique du TCR

Le fait que malgré leur nature diploïde, les clones T n'expriment généralement qu'une seule chaîne  $\beta$  indique que le locus  $\beta$  du TCR subit une exclusion allélique, c'est-à-dire un mécanisme par lequel un réarrangement VDJ $\beta$  productif sur un allèle bloque le réarrangement de l'autre allèle (Malissen et al., 1992). Les souris pT $\alpha$ -déficientes présentent une fréquence élevée de précurseurs T exprimant deux réarrangements VDJ $\beta$  complets, indiquant un rôle clef joué par le pré-TCR dans l'exclusion allélique  $\beta$ . En revanche, environ un tiers des cellules T matures portent deux réarrangement  $\alpha$  productifs chez la souris (Casanova et al., 1991), bien que seuls 3 à 10% expriment deux TCR  $\alpha\beta$  distincts à leur surface (Heath et al., 1995; Corthay et al., 2001). Ceci est dû au fait que le thymocyte immature continue de réarranger ses loci  $\alpha$  jusqu'à ce qu'il reçoive un signal de sélection positive à la suite de l'engagement de son TCR (Turka et al., 1991). L'expression en surface de deux TCR peut conduire à une expression à bas bruit d'un TCR autoréactif, échappant aux contraintes de sélection négative et représentant dès lors un facteur d'autoimmunité (Sarukhan et al., 1998; T Zal et al., 1996). D'autre part, l'expression d'un second TCR en plus de celui requit pour la sélection positive peut contribuer à la diversité du répertoire T (He et al., 2002).

#### 3. Sélection thymique

#### 3.1. Rôle de l'avidité des interactions TCR-pCMH du soi

La finalité des processus de sélections thymiques est d'identifier, parmi l'énorme répertoire de TCR générés de manière aléatoire, ceux qui présentent une potentielle « utilité » pour le système immunitaire, c'est-à-dire ceux capables de reconnaître un peptide antigénique présenté par une molécule de CMH du soi sans pour autant constituer un danger pour l'organisme (TCR autoréactifs). Les thymocytes DP, selon la spécificité de leur TCR pour des ligands intrathymiques, vont s'engager sur l'une des trois voies schématisées dans la figure 6: la mort « par négligence », la sélection positive, ou la sélection négative.



Figure 6 : Devenirs des thymocytes DP selon le modèle de sélection basé sur l'avidité des interactions TCR-pCMH (Palmer, 2003)

Les thymocytes DP expriment un répertoire de TCR non sélectionné. L'absence d'engagement du TCR avec un complexe peptide du soi / CMH conduit à la mort du thymocyte (mort par négligence). Les cellules DP exprimant un TCR reconnaissant des complexes peptide du soi/CMH avec une forte avidité entrent en apoptose (c'est la sélection négative), tandis que celles exprimant un TCR d'avidité intermédiaire pour des ligands peptide du soi/CMH survivent et se différencient en thymocytes simples positifs CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (c'est la sélection positive). Les thymocytes SP matures sortent du thymus et forment le répertoire T périphérique.

La reconnaissance de complexes peptides du soi / CMH par le TCR conditionne l'engagement du thymocyte vers sa survie, ou vers sa mort. Pour résoudre cet apparent paradoxe, le modèle classique, largement accepté, propose que les thymocytes sont orientés en fonction de l'avidité de leur TCR pour les complexes pCMH rencontrés dans le thymus (Daniels et al., 2006) (Fig. 7). L'avidité de l'interaction TCR-pCMH est déterminée par de nombreux paramètres, parmi lesquels la densité de l'antigène à la surface de l'APC (qui est elle-même dépendante de l'affinité du peptide pour la molécule du CMH), l'affinité du TCR pour le complexe pCMH, et l'engagement des corécepteurs. Elle représente donc la force globale d'interaction entre une cellule T et son APC.



Figure 7 : Le modèle d'avidité de l'interaction TCR-pCMH pour la sélection des thymocytes DP (Klein et al., 2009)

L'axe des abscisses indique l'avidité de l'interaction TCR-pCMH.

#### 3.1.1. La mort par négligence

La mort « par négligence » est une forme passive de mort cellulaire causée par l'incapacité d'un thymocyte immature à recevoir un signal via son TCR. Ces cellules ne passent pas l'étape de sélection positive et meurent faute de recevoir un signal de survie. Environ 90% des thymocytes DP meurent pour cette raison (Starr et al., 2003).

L'efficacité de ce mécanisme de sélection dans l'identification de TCR potentiellement « utiles » nécessite que les thymocytes DP dépendent entièrement des signaux de signalisation du TCR pour leur survie, et qu'ils soient sourds à tout autre signal de survie. Ainsi, ces cellules DP sont les seules de la lignée T qui soient réfractaires à l'IL-7 ainsi qu'à de nombreuses autres cytokines de survie (Qing Yu et al., 2006), et ont une durée de vie de 3 à 4 jours en l'absence de signal TCR (Sprent et Webb, 1987).

De plus, ces cellules sont aussi les seules qui expriment les deux corécepteurs CD4 et CD8. Ce phénotype DP a plusieurs conséquences notables. Les domaines extracellulaires des corécepteurs CD4 et CD8 se lient spécifiquement aux domaines invariants des molécules du CMH de classe II et I respectivement, avec une affinité cependant trop faible pour être engagés indépendamment du récepteur T, tandis que leurs domaines intracellulaires sont associés à la protéine tyrosine kinase LCK, qui initie la transduction du signal TCR lorsqu'elle est activée (Doyle et Strominger, 1987; Norment et al., 1988; Shaw et al., 1989b; Turner et al., 1990). En fixant le même complexe pCMH que le TCR, les corécepteurs placent la LCK à proximité des domaines intracytoplasmiques du TCR pour initier la signalisation

(Veillette, Bookman, et al., 1989; Veillette, Zúñiga-Pflücker, et al., 1989). Les thymocytes DP expriment les deux corécepteurs : ils peuvent donc recevoir des signaux des TCR restreints par les CMH des deux classes, de façon à ce que tous les TCR potentiellement « utiles » puissent générer des signaux de sélection positive et sauver les thymocytes DP de la mort « par négligence ».

D'autre part, les deux corécepteurs fixent la LCK, et diminuent ainsi la quantité de LCK libre pour le TCR (Haughn et al., 1992). En conséquence, la signalisation par le TCR des cellules DP est exclusivement dépendante du co-engagement de l'un ou de l'autre des corécepteurs par un complexe pCMH (Van Laethem et al., 2007). Les TCR qui engagent des ligands non CMH (comme n'importe quel ligand intrathymique) le font indépendamment des corécepteurs, et ne pourront donc pas sauver le thymocyte DP de la mort programmée.

#### 3.1.2. La sélection positive

D'après le modèle de sélection sur l'avidité de l'interaction TCR-pCMH, les thymocytes DP sont « sauvés » de la mort par négligence s'ils reçoivent un signal d'intensité intermédiaire via leur TCR (Sprent et Webb, 1987; Benoist et Mathis, 1989; Sprent, 1993; Fink et Bevan, 1995; Sebzda et al., 1999). Des expériences d'imagerie en temps réel sur des lobes thymiques intacts ont révélé que tandis que les thymocytes DN restent immobiles dans le cortex thymique, les thymocytes DP se déplacent de façon aléatoire (Bousso et al., 2002; Li et al., 2007; Witt et Robbins, 2005), suggérant que la différentiation en cellule DP coïncide avec l'acquisition de la motilité cellulaire, et donc la recherche dynamique de l'engagement du TCR. Les thymocytes DP qui se déplacent dans le cortex entrent en contact avec des cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) et s'arrêtent lorsque leur TCR interagit avec un complexe pCMH (Bhakta et Lewis, 2005).

L'engagement du TCR transduit au thymocyte DP un signal de sélection positive, qui déclenche des signaux de maturation, inhibe l'expression des protéines RAG (terminant ainsi le réarrangement des loci  $\alpha$  du TCR), augmente le taux d'expression du TCR, déclenche le choix de lignage CD4/CD8 (voir partie suivante) et induit l'expression de CCR7 à sa surface (Campbell et al., 1999; Ngo et al., 1998; T. Ueno, 2004). Les ligands de CCR7 dans le thymus étant essentiellement exprimés par les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) (Ueno et al., 2004), les cellules positivement sélectionnées migrent vers la médulla.

#### 3.1.3. La sélection négative

À la suite de leur sélection positive et de leur choix de lignage CD4/CD8 (voir partie suivante), les thymocytes SP migrent dans la médulla, où ils scannent activement, durant 4 à 5 jours, les cellules présentatrices de l'Ag (CPA) médullaires (essentiellement les mTEC et les cellules dendritiques ou DC) à la recherche de ligands de sélection négative (Le Borgne et al., 2009). Selon le modèle de sélection sur l'avidité, la sélection négative se produit lorsque le TCR d'un thymocyte engage un complexe pCMH avec une forte avidité, conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Starr et al., 2003). Environ 50% des thymocytes positivement sélectionnés (soit 5% des thymocytes DP) meurent par sélection négative (van Meerwijk et al., 1997; Laufer et al., 1999). Ce mécanisme de sélection élimine ainsi des cellules potentiellement auto-réactives, et génère un répertoire de lymphocytes T relativement tolérant au soi. Après 4 ou 5 jours dans la médulla, les thymocytes n'ayant pas été négativement sélectionnés quittent le thymus pour la périphérie. L'auto-réactivité des cellules T échappant à la sélection négative est contrôlée par de nombreux mécanismes périphériques, parmi lesquels la délétion clonale, l'induction d'un état anergique, l'inhibition fonctionnelle par d'autres cellules, et la séquestration de l'auto-Ag (Kruisbeek et al., 1992; Fowlkes et Ramsdell, 1993; Nossal, 1993; Sprent, 1995; Sprent et Webb, 1995).

#### 3.2. Les complexes pCMH impliqués dans les sélections thymiques

Le répertoire T périphérique est composé de lymphocytes capables d'interagir via leur TCR avec des complexes peptide du soi/CMH rencontrés au cours de leur maturation thymique. Cependant, des expériences menées *in vitro* ont révélé que la sélection positive de cellules T fonctionnelles nécessitait des peptides antagonistes ou agonistes partiels (Hogquist et al., 1993). Les peptides du soi capables de médier la sélection positive d'un lymphocyte *in vitro* présenteraient donc une structure tridimensionnelle non identique, bien qu'apparentée, aux ligands capables d'activer la cellule T mature en périphérie. En accord avec ce modèle, les cTEC présentent à leur surface un répertoire peptidique différent de celui présenté par les CPA médullaires ou périphériques.

#### 3.2.1. Présentation antigénique dans le cortex thymique

De nombreux types cellulaires, incluant les cTEC, les fibroblastes (Hugo et al., 1993), les DC (Pawlowski et al., 1993) et les thymocytes en développement (Wei Li et al., 2005) ont la capacité d'induire une sélection positive des thymocytes DP. Cependant, des découvertes récentes indiquent que les cTEC génèrent un répertoire de complexes pCMH via des mécanismes distincts de ceux utilisés par les autres cellules thymiques et par les CPA périphériques (Fig. 8).



Figure 8 : Mécanismes de génération des complexes pCMH de classes I et II par les cTEC (Klein et al., 2009).

Les peptides présentés par les CMH de classe I sont essentiellement générés par le thymoprotéasome. Pour ce qui est de la présentation sur le CMH de classe II, les cTEC ne sont pas capables de réaliser un chargement des peptides d'origine exogène endocytés, mais présentent une activité macroautophagique importante qui fournit les lysosomes en protéines endogènes diverses (Klein et al., 2009). En outre, dans les lysosomes, la dégradation protéolytique est (au moins en partie) assurée par la cathepsine L et la sérine protéase thymus-spécifique (ou TSSP), qui sont exprimées spécifiquement dans ces cellules.

#### Le thymoprotéasome

Les cTEC expriment un protéasome particulier, appelé thymoprotéasome (Murata et al., 2007). Les protéasomes sont des complexes protéasiques responsables entre autres de la génération des peptides antigéniques présentés sur les molécules du CMH de classe I (Kloetzel, 2001). Le protéasome 20S est responsable de l'activité protéolytique du protéasome et est composé de 28 sous-unités : deux anneaux  $\alpha$  avec les sous-unités  $\alpha 1$  à  $\alpha 7$ , et deux anneaux  $\beta$  avec les sous-unité  $\beta 1$  à  $\beta 7$  (Fig. 9).



Figure 9 : Représentation schématique des unités 208 des protéasomes impliqués dans les mécanismes immunitaires (Klein et al., 2009).

Les sous-unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$  déterminent la position C-terminale des peptides (Rock et al., 2004) et clivent préférentiellement après des résidus acides (activité catalytique caspaselike), basiques (trypsine-like) et hydrophobes (chymotrypsine-like), respectivement (Coux et al., 1996). Les résidus hydrophobes, et donc l'activité chymotrypsine-like, sont essentiels pour l'ancrage des extrémités C-terminales des peptides dans la poche du CMH de classe I (Fehling et al., 1994). L'IFNy induit la production des sous-unités ß1i, ß2i et ß5i, qui remplacent alors leurs homologues \beta1, \beta2 et \beta5 pour constituer l'immunoprotéasome, un complexe présentant une activité chymotrypsine-like augmentée (Kloetzel, 2001). La sousunité ß5t est exprimée spécifiquement dans le thymus et exclusivement par les cTEC. Elle s'incorpore dans l'immunoprotéasome à la place de ß5i pour constituer le thymoprotéasome. Le thymoprotéasome présente une activité chymotrypsine-like diminuée (Murata et al., 2007), et de ce fait génère des peptides présentant une faible affinité pour la poche du CMH de classe I. Les cTEC présentent donc à leur surface des complexes pCMH I d'une part relativement instables, et d'autre part constitués d'un répertoire peptidique potentiellement différent des autres cellules, et notamment des mTEC et des cellules dendritiques trouvées dans la médulla. Les souris  $\beta$ 5t-déficientes développent un répertoire T CD8<sup>+</sup> qualitativement altéré, mais présentent des compartiments DP et CD4<sup>+</sup> normaux (Nitta et al., 2010), suggérant que les

thymoprotéasomes des cTEC sont responsables de la génération des peptides qui sélectionnent positivement les thymocytes exprimant un TCR restreint par le CMH de classe I. L'instabilité des peptides thymoprotéasomes-dépendants dans le sillon du CMH I peut être un facteur qui limite la durée ou l'avidité de l'interaction avec les TCR, et ainsi contribuer à induire la sélection positive d'une fraction importante de thymocytes CMH I-restreints (Murata et al., 2007; Takahama et al., 2008).

#### Macroautophagie

Les TEC expriment fortement les molécules du CMH de classe II, mais contrairement aux CPA d'origine hématopoïetique (telles que les DC trouvées dans la médulla thymique), ne sont pas capables de présenter des peptides dérivés de protéines extracellulaires (Kasai et al., 1998; Oukka et al., 1997). En revanche, les TEC sont capables de macroautophagie, un processus catabolique par lequel des portions de cytoplasme d'environ 1 µm de diamètre et pouvant contenir des mitochondries ou des fragments de noyau sont fusionnées avec des endosomes et des lysosomes pour être recyclées. Ce processus est impliqué dans l'apport d'antigènes intracellulaires à la machinerie de chargement du CMH de classe II (pour revue, Münz, 2009). Le thymus est le plus important site de macroautophagie constitutive, et parmi les CPA thymiques, l'activité autophagique la plus importante est détectée dans les cTEC (Nedjic et al., 2008). L'analyse de souris macroautophagie-déficientes suggère que ce processus non conventionnel de dégradation protéolytique est nécessaire pour la génération de certains complexes pCMH de classe II impliqués dans la sélection positive (Nedjic et al., 2008).

#### Dégradation protéolytique thymus-spécifique

Les premières preuves d'un mécanisme protéolytique distinct remodelant le répertoire de peptides présenté par les cTEC viennent de l'identification d'un rôle déterminant des cathepsines dans le développement des cellules T  $CD4^+$ . Les cathepsines sont des protéases lysosomales impliquées dans la dégradation de la chaîne invariante Ii (qui protège les molécules du CMH de classe II d'un chargement précoce), et dans la génération de peptides antigéniques à partir de substrats lysosomaux (Honey et Rudensky, 2003). Les cTEC expriment préférentiellement la cathepsines L (codée par le gène *Ctsl*), tandis que les autres CPA d'origine hématopoïétique et les mTEC expriment majoritairement la cathepsine S. L'inactivation du gène *Ctsl* conduit à une réduction de 60 à 80% du compartiment SP4. L'analyse de souris déficientes en cathepsines L et en chaîne Ii a montré que cette réduction n'est pas due au clivage inefficace de la chaîne Ii, mais bien à une modification au moins

partielle du répertoire de peptides présenté sur les CMH de classe II des cTEC (Honey et al., 2002).

D'autre part, l'hypothèse que les cTEC utilisent des mécanismes spécifiques pour la génération de peptides CMH II-restreints est appuyée par la découverte d'une sérine protéase (nommée TSSP et codée par le gène *Prss16*) à la suite d'un criblage des gènes exprimés spécifiquement par les cTEC (Bowlus, 1999). Des polymorphismes du gène *Prss16* ont récemment été associés à une prédisposition au développement du diabète auto-immun humain (Viken et al., 2009), suggérant que cette protéase, localisée dans le compartiment lysosomal, joue un rôle dans la génération des peptides CMH II-restreints.

#### 3.2.2. Présentation antigénique dans la médulla thymique

La présentation antigénique dans la médulla assure la tolérogénisation du répertoire T, et est essentiellement réalisée par les mTEC et les DC (Klein et al., 2009).

#### mTEC

En partie grâce à l'expression spécifique de la protéine nucléaire AIRE (pour AutoImmune REgulator), les mTEC expriment des centaines d'antigènes tissus-restreints (TRA), c'est-à-dire des protéines fonctionnellement et structurellement diverses qui ne sont normalement synthétisées que dans les tissus périphériques (par exemple les gènes de l'insuline, de la thyroglobuline, de la protéine basique de la myéline ...) (Klein et al., 1998, 2000; Heath et al., 1998; Werdelin et al., 1998; Derbinski et al., 2001) (Fig. 10).



Figure 10: Expression ectopique d'antigènes tissulaires (TRA) par les mTEC (Kyewski et Derbinski, 2004).

Les Ag exprimés ectopiquement par les mTEC représentent la majorité des tissus parenchymateux, et correspondent à environ 5 à 10% des gènes connus. Chaque mTEC transcrit un nombre limité de gènes, avec une évolution au cours de sa différentiation.

Les mécanismes de régulation par AIRE de cette expression ectopique restent peu clairs, mais impliquent des composants stochastiques, puisque seuls 1 à 3% des mTEC expriment un TRA particulier (Derbinski et al., 2008). Au cours de la maturation des mTEC, l'expression de AIRE et des TRA est associée à l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, et de la molécule d'adhésion ICAM1 (Derbinski et al., 2005), qui sont essentielles pour réaliser la sélection négative (Laufer et al., 1996; Degermann et al., 1994). Comme leurs homologues corticales, les mTEC expriment fortement et constitutivement des molécules de CMH de classe II, mais sont incapables de réaliser un chargement de peptides d'origine exogène (L Klein et al., 2001), suggérant qu'elle réalisent préférentiellement un chargement de peptides endogènes (et notamment dérivés des TRA) par des voies de chargement non conventionnelles.

Deux types de DC sont trouvés dans le thymus, et presque exclusivement dans la médulla : les DC plasmacytoïdes (pDC), qui représentent environ 30% de la population de DC thymiques mais dont la fonction reste mal connue, et les DC conventionnelles (cDC), qui sont subdivisées en cDC autochtones (c'est-à-dire d'origine intrathymique) et en cDC migrantes (c'est-à-dire d'origine périphérique) (Donskoy et Goldschneider, 2003; JiChu Li et al., 2009). Peu après leur entrée dans la médulla thymique, les cDC migrantes surexpriment les molécules de CMH de classe II et de costimulation, et sont capables d'induire la sélection négative des thymocytes spécifiques d'Ag périphériques (JiChu Li et al., 2009). L'hétérogénéité et les origines distinctes des populations thymiques de DC élargissent le répertoire d'Ag du soi présenté aux thymocytes SP dans la médulla. Les cDC migrantes présentent des Ag du soi périphérique qui ne sont pas nécessairement inclus dans les TRA produits par les mTEC, et peuvent éventuellement maintenir une tolérance centrale vis-à-vis d'Ag du non soi dérivés de la flore commensale ou du tube digestif. Pour éviter d'induire une tolérance centrale vis-à-vis d'Ag dérivés de pathogènes, les cDC ne migrent de la périphérie vers le thymus qu'en absence d'engagement de leurs récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) (Bonasio et von Andrian, 2006).

D'autre part, les DC conventionnelles thymiques peuvent capturer et présenter sur leurs molécules du CMH des classes I et II des Ag du microenvironnement médullaire, et notamment les corps apoptotiques contenant les TRA produits par les mTEC (Koble et Kyewski, 2009). De plus, des échanges de complexes pCMH fonctionnels par trogocytose des mTEC vers les cDC ont été documentés (Millet et al., 2008). Ces deux processus, dont les mécanismes restent mal compris, visent probablement à augmenter la probabilité qu'un thymocyte SP auto-réactif rencontre son auto-Ag et soit délété dans les 4 à 5 jours que dure son séjour dans la médulla.

# 3.2.3. La contribution des sélections thymiques au modelage du répertoire T mature

L'impact des sélections positive et négative sur le remodelage du répertoire T périphérique à partir du répertoire T non sélectionné reste un sujet de vifs débats. À la fin des années 70, des expériences sur des modèles de souris chimériques irradiées ont posé le postulat que les cellules T sélectionnées par des complexes peptide du soi/ CMH du soi avaient plus de chance d'être activées par des complexes peptide du non soi/ CMH du soi que les cellules non sélectionnées, ou sélectionnées par des CMH du non soi (von Boehmer et al.,

1978; Bevan, 1977). En accord avec ce modèle selon lequel la sélection positive biaise le répertoire T périphérique vers la reconnaissance des complexes pCMH rencontrés dans le thymus, les cellules T exprimant un TCR transgénique donné peuvent être sélectionnées *in vitro* et *in vivo* par un unique ou un nombre restreint de complexes pCMH (Hu et al., 1997; Ashton-Rickardt et al., 1994; Berg et Davis, 1989), et il a récemment été montré qu'un unique complexe pCMH pouvait sélectionner positivement un répertoire T CD8<sup>+</sup> divers (B. Wang et al., 2009).

À l'inverse, un autre modèle propose que le TCR est intrinsèquement biaisé vers la reconnaissance du CMH (Jerne, 1971; Huseby et al., 2005), c'est-à-dire que les éléments germinaux du TCR (i.e. les segments géniques V(D)J) présentent naturellement une affinité conservée pour le squelette carboné des hélices  $\alpha$  des molécules du CMH des classes I et II. Ce modèle est supporté par les fréquences élevées de cellules T matures réactives vis-à-vis de molécules de CMH allogéniques, c'est-à-dire de molécules sur lesquelles elles n'ont pas été sélectionnées (Matzinger, 1993). D'autre part, le répertoire T murin non sélectionné ou généré en l'absence de molécules du CMH présente déjà une réactivité élevée vis-à-vis du CMH *in vitro* (Merkenschlager et al., 1997; Zerrahn et al., 1997). En accord avec l'hypothèse d'une restriction au CMH intrinsèque aux TCR, plusieurs études ont suggéré que la sélection négative, et non positive, constituait le mécanisme responsable du remodelage intrathymique du répertoire T CD4<sup>+</sup> (Ignatowicz et al., 1996, 1997; Huseby et al., 2005; Tourne et al., 1997).

En plus de ces remodelages dus aux sélections thymiques, les processus homéostatiques périphériques, en favorisant la survie et l'expansion des cellules T naïves capables d'établir continuellement des interactions de faible affinité avec le CMH du soi, contribuent également au sculptage du répertoire périphérique et à sa focalisation vers la reconnaissance du CMH du soi (Takeda et al., 1996; Tanchot et al., 1997).

#### 4. Choix de lignage CD4/CD8

Les thymocytes DP étant des cellules bipotentes (c'est-à-dire pouvant se différencier en cellules SP4 ou SP8), exprimant les deux corécepteurs CD4 et CD8, le choix du lignage CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> a longtemps été considéré comme l'extinction irréversible de l'un des deux gènes de corécepteurs suite à l'engagement du TCR. Tous les modèles « classiques » de choix de lignage CD4/CD8 considèrent de plus que sélection positive et choix de lignage sont deux événements simultanés, induits par les mêmes signaux TCR-dépendants. Nous présenterons ici les modèles classiques de choix de lignage CD4/CD8, ainsi que le modèle cinétique, qui

émerge aujourd'hui comme celui proposant une image cohérente et unifiée des données actuelles de ce domaine.

#### 4.1. Le modèle stochastique

Le modèle de sélection stochastique postule qu'au cours de la sélection positive, le thymocyte DP éteint de façon aléatoire l'un de ses gènes codant pour un corécepteur (Cd4 ou Cd8) (Chan et al., 1993; Davis et al., 1993; Itano et al., 1994; Leung et al., 2001). Une seconde étape de sélection TCR-dépendante se déroulerait au stade SP, de façon à ce que seuls survivent et deviennent matures les thymocytes exprimant le corécepteur assorti à la restriction pour le CMH de classe I ou de classe II du TCR.

Le choix du corécepteur étant aléatoire, ce modèle prédit que 50% des TCR potentiellement utiles seraient perdus, car exprimés par des thymocytes n'exprimant plus le corécepteur adéquat. Cependant, des expériences mesurant l'efficacité du choix de lignage de thymocytes portant des TCR transgéniques ont démontré que le taux d'efficacité pouvait atteindre 90%, soit beaucoup plus que les prédictions du modèle stochastique (Itano et E Robey, 2000). De plus, la seconde étape de sélection TCR-dépendante de ce modèle suppose que les thymocytes nouvellement SP aient une durée de vie courte et qu'ils meurent rapidement en absence d'engagement simultané de leurs TCR et corécepteur sur la même molécule du CMH. Cette nécessité est contredite par l'observation que des cellules SP, exprimant un TCR et un corécepteur non assorti, peuvent se différencier en cellules T matures et migrer vers la périphérie (Keefe, 1999; Sarafova et al., 2005). Les principes clefs du modèle stochastique ont donc été contredits par l'observation expérimentale.

#### 4.2. Le modèle instructif

Le modèle instructif postule qu'au cours de la sélection positive, la signalisation par le TCR dirige les thymocytes DP pour éteindre spécifiquement le corécepteur non assorti. Ce modèle nécessite donc que les signaux des TCR restreints par les CMH de classes I et II soient suffisamment différents l'un de l'autre pour spécifier l'extinction de l'un ou l'autre des corécepteurs. Les TCR CMH I- et CMH II-restreints présentant des affinités similaires pour leurs ligands, c'est la différence d'intensité des signaux corécepteurs-dépendants qui indiquerait aux thymocytes DP le gène *Cd4* ou *Cd8* à éteindre (Itano et al., 1996). Le domaine intracytoplasmique du CD4 fixe significativement plus de LCK que celui du CD8 (Shaw et al., 1989b; Wiest et al., 1993), et l'engagement du CD4 génère donc des signaux plus forts

que l'engagement du CD8. Dans le modèle instructif, c'est cette différence quantitative dans l'intensité du signal qui déterminerait le choix de lignage CD4 ou CD8 (Itano et al., 1996).

L'effet de l'intensité du signal TCR sur le choix du lignage a été testé expérimentalement en modifiant le nombre de domaines ITAM contenus dans chaque complexe de signalisation du TCR. La réduction du nombre de domaines ITAM réduisait l'intensité de signalisation du TCR et entraînait une diminution du nombre de thymocytes SP, mais n'avait pas d'impact sur le choix de lignage CD4/CD8 (Love et al., 2000). Indépendamment du nombre d'ITAM, et donc de la force du signal TCR, les thymocytes exprimant des TCR restreints par le CMH de classe II se différenciaient en cellules CD4<sup>+</sup>, ceux exprimant des TCR restreints par le CMH de classe I devenaient CD8<sup>+</sup> (Holst et al., 2008). Ainsi, le modèle instructif de choix du lignage CD4/CD8 a été invalidé par l'expérience.

#### 4.3. Le modèle cinétique

Le modèle cinétique a émergé suite aux récentes contradictions constatées entre les modèles classiques et les observations expérimentales. En particulier, des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* ont indiqué que les thymocytes DP ayant reçu un signal de sélection positive par leur TCR éteignent le gène Cd8, mais pas le Cd4, et ce indépendamment de la restriction au CMH de leur TCR (Brugnera et al., 2000). De plus, malgré l'extinction du Cd8, ces thymocytes positivement sélectionnés gardent la capacité de se différencier en cellules T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Ces observations sont en totale contradiction avec les principes de base des modèles classiques, selon lesquels l'extinction d'un gène de corécepteur est définitive et indicative du choix du lignage opposé.

Ainsi, dans le modèle cinétique, les événements de sélection positive et de choix de lignage sont séquentiels, et non simultanés. Dans un premier temps, les thymocytes DP ayant reçu un signal de sélection positive via leur TCR éteignent le gène *Cd8*, devenant ainsi *Cd4*<sup>+</sup> *Cd8*<sup>-</sup> et exprimant de moins en moins de CD8 à leur surface (Fig. 11). Dans un second temps, ces thymocytes évaluent l'effet de l'absence de CD8 sur le signal TCR-dépendant (Brugnera et al., 2000; Singer et Bosselut, 2004). Si le signal persiste en l'absence de transcription *Cd8*, le thymocyte devient CD4<sup>+</sup>. Si le signal cesse en l'absence de transcription *Cd8*, le thymocyte devient CD8<sup>+</sup> (Fig. 11). En effet, la signalisation d'un TCR engagé par un complexe pCMH de classe II ne sera pas dépendante du CD8 et persistera donc en l'absence de transcription *Cd8*. À l'inverse, la signalisation d'un TCR restreint par le CMH de classe I est dépendante du CD8 et cessera donc en absence de transcription. Selon l'affinité et la CD8-dépendance du TCR classe I-restreint exprimé, l'engagement du TCR cessera plus ou moins longtemps après

l'extinction du gène *Cd8*, et donc l'apparence des thymocytes *Cd4<sup>+</sup> Cd8<sup>-</sup>* pourra couvrir un large spectre, allant du phénotype  $CD4^+CD8^+$  (si le TCR est très CD8-dépendant) à  $CD4^+CD8^-$  (si le TCR est CD8 indépendant) (Singer, 2002). Cependant, la majorité des thymocytes intermédiaires sont  $CD4^+CD8^{-}$ .



Figure 11 : Schéma du développement des lymphocytes T dans le thymus suivant l'expression de surface des corécepteurs CD4 et CD8, selon le modèle cinétique de choix de lignage CD4/CD8.

Les cellules doubles négatives (DN) sont les plus immatures dans le thymus. Elles se différencient en cellules doubles positives (DP) à la suite de la sélection  $\beta$ . Quelle que soit la spécificité de leur TCR, les thymocytes DP recevant un signal de sélection positive via leur TCR arrêtent la transcription du gène *Cd8*, devenant ainsi des thymocytes intermédiaires *Cd4*<sup>+</sup>*Cd8*<sup>-</sup> apparaissant CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>. C'est à ce stade que se fait le choix du lignage : la persistance du signal TCR induit la différentiation en cellules CD4<sup>+</sup> matures. La cessation du signal TCR induit une inversion des corécepteurs, les thymocytes *Cd4*<sup>+</sup>*Cd8*<sup>-</sup> devenant *Cd4*<sup>-</sup>*Cd8*<sup>+</sup> et se différenciant en cellules CD8<sup>+</sup> matures.

#### A. ASPECTS CINÉTIQUES DE L'INTERACTION TCR - PCMH

L'orchestration des événements de signalisation, de la reconnaissance du complexe pCMH à l'activation des fonctions effectrices de la cellule, est réalisée dans un environnement localisé de la cellule T, appelé synapse immunologique, et nécessite l'activité coordonnée de différentes molécules associées au TCR, notamment les corécepteurs CD3 et CD4 ou CD8, et d'autres molécules de costimulation. Toutefois, les aspects cinétiques de l'interaction TCR - pCMH (constante d'affinité K<sub>D</sub>, taux d'association K<sub>on</sub> et taux de dissociation  $K_{off}$ , liés par l'équation  $K_D = K_{off} / K_{on}$ ) ont été étudiés le plus souvent par résonance plasmonique de surface et microcalorimétrie en utilisant des protéines recombinantes solubles. Bien que très utiles pour disposer de données précises et comparables, ces mesures ne tiennent pas compte de la complexité de l'environnement synaptique, et en particulier ne corrèlent pas toujours avec les propriétés fonctionnelles  $(EC_{50})$ du lymphocyte T (Huang et al., 2010). Alternativement, l'utilisation de tétramères fluorescents de complexes pCMH recombinants a permis une mesure de l'avidité (K<sub>D</sub> apparent) et du taux de dissociation ( $t_{1/2}$  ou  $K_{off}$ ) de l'interaction TCR-ligand en conservant l'intégrité de la membrane de la cellule T, mais en présentant le désavantage d'être relativement peu résolutif (Savage et al., 1999; Trautmann et al., 2005; Fazilleau et al., 2009). Très récemment, deux groupes indépendants ont pu mesurer in situ les paramètres cinétiques de l'interaction TCR – pCMH, en exploitant des approches complexes d'imagerie (Huppa et al., 2010; Huang et al., 2010). Probablement à cause de phénomènes de clustering des récepteurs en surface de la cellule T, les résultats montrent des taux d'associations beaucoup plus rapides que ceux obtenues par BIAcore, et réconcilient les données cinétiques et fonctionnelles.

#### B. ASSOCIATION DU COMPLEXE TCR-CD3

Le TCR est composé de deux chaînes polypeptidiques glycosylées ( $\alpha$  et  $\beta$ ) appartenant à la super famille des immunoglobulines (Ig). Chaque chaîne comprend deux domaines extracellulaires semblables à ceux des Ig (un domaine variable (V) amino terminal et un domaine constant (C) carboxyterminal), un domaine transmembranaire hydrophobe et une courte queue intracytoplasmique. L'association de la partie variable des deux chaînes du

TCR, qui contient les domaines hypervariables ou CDR, forme le site de reconnaissance du complexe pCMH. Le TCR  $\alpha\beta$  permet la reconnaissance spécifique de l'Ag, mais ne possède qu'un court domaine intracytoplasmique dépourvu de toute activité enzymatique intrinsèque. La transduction du signal après l'interaction TCR-pCMH est assurée par le complexe multimérique appelé CD3. Quatre sous-unités distinctes, étroitement associées au TCR et appelées  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  et  $\zeta$  ont été identifiées dans le complexe CD3 (Borst et al., 1983) (Fig. 12).



Figure 12 : Le complexe TCR-CD3 (Schumacher, 2002).

Les chaînes CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  et CD3 $\epsilon$  sont constituées d'un domaine extracellulaire aminoterminal de type Ig, d'un domaine transmembranaire chargé négativement qui permet aux chaînes CD3 d'interagir avec les domaines transmembranaires du TCR et enfin d'un domaine intracytoplasmique carboxyterminal. La chaîne CD3 $\zeta$  possède un très court domaine extracellulaire mais un long domaine intracellulaire. Les domaines intracytoplasmiques contiennent des séquences renfermant des motifs ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs : YxxL(X)<sub>6-8</sub>YxxL). Après avoir été phosphorylés, ces ITAM servent de point d'ancrage pour des protéines importantes de la signalisation (Samelson et al., 1985). La stoechiométrie du complexe TCR-CD3, la séquence de son assemblage et la nature des interactions entre les sous-unités sont longtemps restés énigmatiques. Il semble résolu que le complexe TCR-CD3 soit constitué d'hétérodimères TCR $\alpha\beta$ , CD3 $\epsilon\gamma$ , CD3 $\epsilon\delta$  et de

l'homodimère CD3ζζ (Call et al., 2002; Call et Wucherpfennig, 2004) (Fig. 13).


Figure 13 : Organisation du complexe TCR-CD3 basée sur l'interaction de résidus transmembranaires (Call et Wucherpfennig, 2004).

Chaque étape d'assemblage implique un résidu transmembranaire basique du TCR (cercles bleus), et deux résidus transmembranaires acides des dimères CD3 (cercles rouges). La formation du complexe dépend donc du positionnement correct de neuf résidus transmembranaires ionisables. Les domaines ITAM sont représentés par des ellipses grises.

La formation du complexe se réalise dans le réticulum endoplasmique selon des mécanismes rigoureusement contrôlés. La chaîne  $\alpha$  du TCR s'associe avec l'hétérodimère CD3 $\epsilon\delta$ , tandis que la chaîne  $\beta$  s'associe avec le CD3 $\epsilon\gamma$ . Les deux trimères ainsi formés s'associeront via un pont disulfure entre les chaînes a et b pour former l'hexamère TCR $\alpha\beta$ CD3 $\epsilon\gamma$ CD3 $\epsilon\delta$ . Après association avec l'homodimère  $\zeta\zeta$ , le complexe TCR-CD3 fonctionnel est exporté à la surface de la cellule (Alarcon et al., 1988; J B Huppa et Ploegh, 1997). Ainsi, le complexe CD3 est non seulement nécessaire à la signalisation en aval du TCR, mais il permet aussi l'expression stable du TCR en surface.

#### C. Les corécepteurs CD4 et CD8

Les corécepteurs CD4 et CD8 diffèrent par leurs structures et leurs caractéristiques de liaison aux domaines invariants des molécules du CMH. Le CD8 est un hétérodimère constitué d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , qui coopèrent pour former un unique site de liaison au domaine  $\alpha$ 3 du CMH de classe I (van der Merwe et Davis, 2003). Le CD4 est un monomère présentant un seul site de liaison au CMH de classe II. La tyrosine kinase LCK s'associe aux domaines intracellulaires des deux corécepteurs, mais présente une affinité plus

forte pour le CD4, ce qui peut augmenter l'efficacité de la signalisation CMH II-dépendante. Cependant, l'affinité du CD8 pour le CMH de classe I est supérieure à celle du CD4 pour le CMH de classe II, qui tombe sous le seuil de détection par BIAcore (van der Merwe et Davis, 2003). Des expériences utilisant des tétramères de complexes pCMH II ont montré que l'interaction entre le CD4 et le CMH II n'avait pas d'effet sur la fixation du TCR au tétramère (Boniface et al., 1998; Crawford et al., 1998; Hamad et al., 1998). À l'inverse, l'interaction CD8-CMH I a un impact important sur la fixation des TCR aux tétramères de complexes pCMH I (Daniels et Jameson, 2000; Kerry et al., 2003).

#### D. Rôle des corécepteurs CD4 et CD8 dans l'activation de la cellule T

Le modèle classique d'activation du lymphocyte T propose qu'un complexe stable soit formé lorsqu'un TCR et un corécepteur CD4 ou CD8 engagent un peptide antigénique présenté par une molécule du CMH (Fig. 14). Cette interaction déclenche la cascade de signalisation du TCR en permettant la phosphorylation des ITAM associés aux CD3 par la tyrosine kinase LCK, qui est associée au domaine intracytoplasmique de chacun des corécepteurs.



Figure 14: Modèle classique de l'activation du lymphocyte T αβ via ses TCR et corécepteur (Gascoigne, 2008).

Ce modèle classique entre en conflit avec plusieurs observations expérimentales :

- On sait de longue date que les TCR du lymphocyte T doivent être multimérisés, ou « crosslinkés » (par exemple par un Ac anti-CD3 (Kappler et al., 1983) ou par des multimères de complexes pCMH (Boniface et al., 1998)) pour transduire un signal d'activation. Or, en conditions physiologiques, la densité des complexes peptide antigénique/CMH à la surface de la CPA est extrêmement faible : 0,03% de l'ensemble des complexes pCMH présents à la surface de la CPA (Demotz et al., 1990), alors que le lymphocyte T ne scanne que 5-10% de cette surface (Irvine et al., 2002). La probabilité pour un TCR d'engager plusieurs de ces complexes simultanément est donc quasiment nulle.
- Lorsqu'un lymphocyte T rencontre une CPA présentant des peptides antigéniques à sa surface, on trouve dans la synapse immunologique des complexes pCMH antigéniques, mais aussi des complexes pCMH endogènes, c'est-à-dire des molécules de CMH présentant des peptides du soi, non stimulants (Wülfing et al., 2002).
- Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves sont partiellement activées lorsqu'elles contactent des complexes pCMH II endogènes *in vivo*, en absence de leur Ag. Cette activation partielle se traduit par une légère phosphorylation des ITAM du CD3ζ, et une sensibilité accrue à la stimulation par le complexe pCMH II antigénique (Stefanová et al., 2002).
- De la même façon que pour les cellules T CD4<sup>+</sup>, l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peut être facilitée par l'interaction du TCR avec des complexes pCMH I non stimulants, lorsque les concentrations de complexes pCMH antigéniques sont sous optimales (Yachi et al., 2005, 2007). Les peptides non stimulants peuvent être d'origine endogène (i.e. du soi) ou exogène (du non soi).

D'autre part, il a été montré qu'un seul pCMH antigénique, lorsqu'il est présenté à la surface d'une CPA (et non lorsqu'il est soluble), peut suffire à induire la mobilisation de Ca2<sup>+</sup> intracellulaire d'un T CD4 (Irvine et al., 2002).

La sommation de ces données a conduit à l'élaboration d'un nouveau modèle d'activation du lymphocyte T. Ce modèle, dit du pseudo-dimère, repense les rôles des corécepteurs, mais aussi des complexes pCMH endogènes, dans l'interaction T-APC (Krogsgaard et Davis, 2005). Le modèle du pseudo-dimère propose que le crosslinking des TCR du lymphocyte T est réalisé par le corécepteur, qui lie deux TCR, l'un étant en interaction avec un complexe pCMH antigénique, l'autre avec un complexe pCMH endogène

(Fig. 15) (Krogsgaard et Davis, 2005). Le recrutement de complexes pCMH endogènes à la synapse immunologique est dépendant du peptide endogène considéré, et peut être bloqué par des anticorps (Ac) anti-TCR, mais pas par des Ac anti-CD4 (ou la mutation du site de fixation du CD4 au CMH de classe II (Irvine et al., 2002)). C'est donc bien le TCR, et non le CD4, qui reconnaît les complexes pCMH endogènes. Les processus de maturation thymique, en sélectionnant positivement les thymocytes immatures capables d'engager avec une faible avidité des complexes pCMH endogènes, assurent ainsi la maintenance d'une activation partielle des lymphocytes T en périphérie (Stefanová et al., 2002).



Figure 15: Le modèle du pseudo-dimère (Gascoigne, 2008).

#### A. Structure du complexe pCMH

Les peptides antigéniques ou endogènes sont présentés aux lymphocytes T  $\alpha\beta$  en complexe avec des molécules du CMH de classe I et II. Ces molécules du CMH sont des hétérodimères composés de trois domaines : un superdomaine formant le site de fixation du peptide, et deux domaines de la famille des Ig (Fig. 16).



Figure 16: Organisation des domaines des molécules de CMH I et II (panel du haut), et site de fixation du peptide (panel du bas) (Rudolph et al., 2006).

Dans les molécules du CMH de classe I, le site de fixation peptidique (appelé domaine  $\alpha 1\alpha 2$ ) est construit par la chaîne lourde, et une chaîne légère, la  $\beta 2$ -microglobuline (ou  $\beta 2m$ ) s'associe au domaine  $\alpha 3$  de la chaîne lourde. Par contraste, le site de fixation du peptide par les molécules du CMH de classe II est formé par deux chaînes lourdes ( $\alpha 1\beta 1$ ). Dans les deux

classes de molécules présentatrices, l'architecture est similaire avec 8 feuillets  $\beta$  représentant le plancher du sillon peptidique, tandis que les bords sont formés de deux longues hélices  $\alpha$ . Les molécules du CMH sont hautement polymorphes (Falk et al., 1991; Rudensky et al., 1990; van Bleek et Nathenson, 1991) (Tableau 1).

HLA-A chaîne lourde		HLA-B chaîne lourde		HLA-C chaîne lourde	
325 allèles592 allèles		175 allèles			
HLA-DP		HLA-DQ		HLA-DR	
chaîne $\alpha$	chaîne β	chaîne $\alpha$	chaîne β	chaîne $\alpha$	chaîne β
20 allèles	107 allèles	27 allèles	56 allèles	3 allèles	447 allèles

Tableau 1 : Polymorphisme des allèles du CMH de classe I et II.

Bien que chaque individu n'exprime pas plus de six allèles de chaque classe, on dénombre plus de 800 allèles de CMH de classe I et 600 allèles de CMH de classe II dans la population humaine (Robinson et al., 2009). Les résidus polymorphes sont localisés sur le pourtour et à l'intérieur de la poche peptidique, et contribuent ainsi à la diversité de peptides potentiellement présentables aux lymphocytes T (Rudolph et al., 2006). Les molécules de CMH de classe I fixent généralement des peptides de 8 à 10 aminoacides, présentant des résidus « ancres » enfouis dans des poches du CMH qui différent d'un allèle à l'autre (Fremont et al., 1992; Madden et al., 1993). Ce mode de fixation du peptide permet de laisser les chaînes latérales des acides aminés peptidiques accessibles pour interagir directement avec le TCR. Les peptides plus longs, à cause de la fixation de leurs extrémités dans le sillon du CMH de classe I, forment une courbe, un bombement faisant ressortir les résidus centraux (on parle alors de peptide protrudant) (Fig. 17). Dans les molécules de classe II au contraire, le sillon est ouvert de chaque côté, et les extrémités du peptide ne sont pas fixées. Les poches peuvent donc accueillir des peptides plus longs (11 à 14 résidus) que les poches de CMH I, et les peptides présentés adoptent tous un parcours similaire, beaucoup plus plat et enfoui dans le sillon de la molécule présentatrice (Fig. 17).



Figure 17: Conformations de peptides présentés par les CMH I (en haut) et les CMH II (en bas) (Rudolph et al., 2006).

Les peptides antigéniques sont représentés en tubes. Les chaînes latérales des résidus du TCR en contact avec les peptides sont représentées en bâtonnets. Les peptides CMH I-restreints de 8, 9 et 13 résidus sont colorés en jaune, rouge et vert, respectivement.

#### B. Structure du TCR $\alpha\beta$ en complexe avec son ligand

Le site de fixation du complexe pCMH est formé par la juxtaposition des domaines hypervariables (CDR) du TCR (Fig. 18). Généralement, le TCR est orienté approximativement en diagonale par rapport au sillon peptidique (Garcia et al., 1996; Garboczi et al., 1996). Le domaine V $\alpha$  est positionné sur la moitié N-terminale du peptide, alors que le V $\beta$  contacte la partie C-terminale. Les contacts avec le peptide sont principalement réalisés par les boucles CDR3, qui présentent de loin la plus grande variabilité génétique. Les contacts avec les hélices  $\alpha$  formant les bords de la poche peptidique sont généralement médiés par les CDR1 et 2 (Rudolph et al., 2006).



Figure 18: Structure du TCRaß en complexe avec son ligand (Gras et al., 2009).

Structure générale d'un complexe TCR-pCMH de classe I (à gauche) et vue détaillée de l'interface TCR-pCMH faisant apparaître le positionnement des boucles CDR (à droite). Le TCR est représenté en gris avec les boucles CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$ , CDR1 $\beta$ , CDR2 $\beta$  et CDR3 $\beta$  colorées respectivement en vert foncé, rouge, bleu foncé, vert clair, orange et bleu claire. Les domaines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 du CMH I sont montrés en mauve or et mauve argent, respectivement. Le peptide est représenté en « ball and sticks » violets.

Même si le mode d'arrimage (ou docking) du TCR sur son ligand est globalement conservé, les formes et propriétés chimiques des surfaces en interaction sont très diverses, et aucun point de contact fixe n'a pu être identifié entre les zones conservées des hélices  $\alpha$  du CMH et les résidus conservés du TCR (Garcia et al., 1996; Ding et al., 1998; Reiser et al., 2002). Cette absence de point de contact conservé à l'interface TCR-CMH suggère que le mode de docking du TCR sur son ligand est imposé soit (i) par les corécepteurs (A Guimezanes et al., 2001; Ely et al., 2006), soit (ii) via un guidage moléculaire relativement lâche, dicté par les domaines V du TCR et les hélices  $\alpha$  du CMH, et constituant la signature moléculaire de la restriction au CMH (Housset et Malissen, 2003). En accord avec cette dernière hypothèse, une fraction importante des thymocytes DP (c'est-à-dire non sélectionnés) présentent déjà une réactivité inhérente vis-à-vis de complexes pCMH exprimés dans le thymus (Zerrahn et al., 1997; Merkenschlager et al., 1997).

#### C. Diversité des complexes pCMH et nécessaire crossréactivité du TCR

La condition minimale pour qu'un peptide soit présenté aux lymphocytes T est qu'il possède des résidus « ancres » qui facilitent son ancrage dans le sillon des molécules présentatrices. On estime qu'environ 3% des peptides de 11 aminoacides contiendraient les motifs de fixation à une molécule de CMH de classe II donnée (Mason, 1998). En admettant que les 8 autres positions peptidiques peuvent être occupées par n'importe lequel des 20 aminoacides existants, environ 6.10<sup>12</sup> peptides de 11 résidus peuvent être présentés par une molécule de CMH II donnée. Si chacun de ces peptides devait être reconnu par un clone T distinct, le répertoire T périphérique devrait être beaucoup plus vaste qu'il ne l'est déjà (Fig. 19), et la cinétique de la réponse immune ne serait pas compatible avec la vitesse d'expansion des agents infectieux (Mason, 1998). Ainsi, la capacité à reconnaître spécifiquement, avec un nombre limité de cellules T, pratiquement n'importe quel complexe pCMH, nécessite un haut degré de dégénérescence (ou crossréactivité) au niveau de l'interaction TCR-pCMH.



Figure 19: Nécessaire crossréactivité des TCR.

Si les cellules T étaient monospécifiques, une souris devrait posséder une rate 70 fois plus grande que le cube représenté (Mason, 1998), en considérant que  $10^9$  lymphocytes occupent un volume d'un mL.

#### 1. Flexibilité conformationnelle des CDR3

L'analyse structurale, par cristallographie des rayons X (Garcia et al., 1996; Reiser et al., 2002; Kjer-Nielsen et al., 2003) ou par résonance magnétique nucléaire (Hare et al., 1999), des TCR libres ou en complexes avec leur ligand a révélé d'importantes réorganisations conformationnelles du site de liaison du TCR. Les modifications majeures sont trouvées dans les boucles CDR3, qui semblent faciliter l'adaptation du TCR à la surface, plutôt rigide, du pCMH (Housset et Malissen, 2003).

Pour expliquer ces différences structurales observées entre les formes libres et complexées des TCR, un modèle dit de « induced fit » a été proposé, selon lequel les partenaires de l'interaction, après la formation initiale d'un complexe sous optimal, réorganiseraient leurs structures pour optimiser l'interaction (Rudolph et al., 2006). Ce modèle d' « induced fit » est à rapprocher du modèle de fixation en deux étapes (ou Two-step binding model) du TCR sur son ligand, qui propose que le TCR établit dans un premier temps des contacts avec les hélices  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 du CMH avant d'explorer le contenu de la poche par ses boucles CDR3 (Wu et al., 2002). Ce mécanisme faciliterait le scanne de très nombreux complexes antigéniques par les cellules T, et fournirait une base à la crossréactivité du TCR. Toutefois, proposé par l'équipe de M. M. Davis à la suite de l'étude par BIAcore de l'interaction TCR 2B4 / MCC-IE<sup>k</sup> (Wu et al., 2002), le « two-step binding model » est probablement moins approprié pour décrire l'interaction du TCR avec un CMH de classe I, qui présente des peptides nettement moins enfouis dans le sillon peptidique (Rudolph et al., 2006). À l'extrême, le TCR contactera nécessairement simultanément le CMH et les chaînes latérales d'un peptide très protrudant (Tynan, Burrows, et al., 2005; Tynan, Borg, et al., 2005). D'autre part, on sait que la capacité d'un anticorps à adopter plusieurs configurations de site de fixation ne dépend pas de mécanismes instructifs, mais plutôt de l'existence d'un équilibre entre différents isomères structuraux, qui préexistent à l'interaction, et qui présentent chacun une configuration particulière de CDR et une spécificité (Housset et Malissen, 2003). De la même façon, il semble plus probable que les CDR des TCR, dans leur forme libre, puissent adopter différentes conformations, dont chacune pourrait potentiellement fixer un complexe pCMH donné.

#### 2. Mimétisme structural

La capacité d'un TCR à reconnaître deux complexes pCMH distincts (c'est-à-dire sa crossréactivité) peut également être expliquée par le mimétisme structural des deux antigènes (Hennecke et Wiley, 2002). Par exemple, le peptide de l'hémagglutinine de l'influenza en complexe avec deux HLA de classe II distincts forme deux complexes aux structures tridimensionnelles très proches, la principale différence résidant dans la conformation du peptide (Hennecke et Wiley, 2002). De façon non surprenante, l'orientation du TCR sur ces complexes pCMH est très similaire pour les deux ligands.

#### E. BASES STRUCTURALES DES SÉLECTIONS THYMIQUES

Les segments géniques V du TCR semblent présenter une prédisposition inhérente à interagir avec le CMH (Zerrahn et al., 1997; Merkenschlager et al., 1997). Cependant, ces interactions intrinsèques sont probablement faibles et peuvent être modulées positivement ou négativement par les chaînes latérales du peptide ou par son squelette carboné (Wang et Reinherz, 2002). Ainsi, il a été suggéré que la majorité des thymocytes DP meurent par négligence parce que des conflits stériques empêchent leur TCR de contacter les résidus peptidiques protrudants dans la poche du CMH (Wang et Reinherz, 2002). Des peptides du soi fixés à des CMH du soi pourraient donc inhiber les interactions TCR-CMH intrinsèques et nuire à la sélection positive (Schumacher et Ploegh, 1994). De façon plus générale, l'architecture d'un sillon peptidique donné impose une signature structurale aux peptides qui s'y logent, et de cette façon restreint le répertoire de TCR (et notamment de CDR3) avec lesquels il peut interagir. Par exemple, à cause d'une arête hydrophobe centrale dans le sillon des CMH murins H-2L<sup>d</sup> et H-2D<sup>b</sup>, tous les peptides présentés par ces molécules « protrudent » en position P6. Cette caractéristique générique empêche probablement l'interaction avec les TCR exprimant un long CDR3ß (Speir et al., 1998). Dans cette perspective, les sélections thymiques auraient pour fonction de calibrer le répertoire de CDR3 réarrangé somatiquement pour qu'il soit assorti (i) aux caractéristiques génériques imposées au peptide par le sillon peptidique des CMH du soi, et (ii) aux résidus polymorphiques des hélices a du CMH du soi. Quant aux boucles germinales CDR1 et CDR2, elles semblent capables d'interagir avec n'importe quelle hélice de CMH de classe I et II (Housset et Malissen, 2003).

#### F. BASES STRUCTURALES DE L'ALLORÉACTIVITÉ

Les allèles d'un locus donné du CMH peuvent différer de seulement 20 aminoacides. La plupart de ces résidus polymorphes sont localisés le long du sillon peptidique, mais quelques-uns se trouvent sur les hélices  $\alpha$  du CMH et sont accessibles au TCR. De nombreux TCR capables de reconnaître des peptides du non soi présentés par des CMH du soi présentent également une crossréactivité pour des CMH du non soi (c'est-à-dire des CMH non rencontrés au cours du développement thymique). Cette crossréactivité est appelée alloréactivité et est responsable du rejet de greffes et de la GvH (Graft versus Host disease). Deux modèles ont été proposés pour rendre compte du fait que la fréquence des lymphocytes T spécifiques d'une molécule de CMH allogénique donnée soit beaucoup plus élevée que celle des lymphocytes T spécifiques de complexes peptide du non soi/CMH du soi (Felix et Allen, 2007).

Le premier propose que les cellules T alloréactives reconnaissent, indépendamment du peptide, des résidus polymorphes présents sur les hélices  $\alpha$  des molécules de CMH allogénique (Fig. 20). La densité de l'antigène reconnu est dès lors très importante et donne lieu à une interaction de très forte avidité, susceptible de compenser la faible affinité du TCR pour le CMH allogénique (Bevan, 1984).

L'autre modèle propose que les cellules T alloréactives reconnaissent leur antigène de façon peptide dépendante, et exploitent les similarités plutôt que les différences structurales entre les hélices  $\alpha$  des CMH du soi et du non soi. La fréquence élevée de cellules T alloréactives est expliquée dans ce modèle par le fait que les molécules allogéniques du CMH présentent un répertoire de peptides endogènes totalement différent du répertoire peptidique rencontré au cours de la sélection négative (Matzinger et Bevan, 1977). Ce second modèle, qui fait de l'alloréactivité une illustration remarquable de la capacité du TCR à reconnaître des configurations du CMH qui sont conservées d'un allèle à l'autre (Marrack et al., 2001), est soutenu par toutes les données structurales disponibles, qui montrent que les TCR alloréactifs contactent toujours à la fois le peptide et les hélices  $\alpha$  du CMH (Housset et Malissen, 2003).



Figure 20: Reconnaissance par le TCR de complexes pCMH conventionnels ou allogéniques (Felix et Allen, 2007).

La zone d'interaction est matérialisée en rouge.

#### G. BASES STRUCTURALES DES BIAIS DE RÉPERTOIRES T AG-SPÉCIFIQUES

Malgré la diversité potentielle des TCRaß, de nombreuses études ont documenté un biais dans le répertoire T au cours de réponses immunitaires induites par infection, transplantation, autoimmunité ou hypersensibilité (Turner et al., 2006). Ces biais sont définis comme l'usage préférentiel de régions V particulières par les lymphocytes T spécifiques d'un complexe pCMH donné. L'analyse sur le long terme de réponses T dirigées contre le CMV, l'EBV ou l'influenza a conduit à la perception que ces biais de répertoire étaient le résultat d'une stimulation antigénique répétée qui favoriserait l'amplification des clones T exprimant les TCR présentant les caractéristiques structurales optimales pour reconnaître le complexe pCMH (Gras et al., 2009; Price et al., 2005; Trautmann et al., 2005). Cependant, les biais de répertoires sont aussi retrouvés au cours des phases aiguës d'infection par d'autres virus (Aebischer et al., 1990; Kedzierska et al., 2004; Moss et al., 1991; Lehner et al., 1995), et même au sein du répertoire T CD8<sup>+</sup> naïf spécifique de l'épitope tumoral MelA<sub>27</sub> (ELAGIGILTV, aussi appelé MART1) présenté par le HLA-A\*0201 (Romero et al., 2002; Pittet et al., 2002; Kawakami et Rosenberg, 1997), suggérant qu'au-delà du remodelage d'un répertoire T pCMH-spécifique suite à des stimulations antigéniques répétées, la topologie d'un complexe pCMH donné peut influer sur la diversité des TCR qui le reconnaissent.

#### 1. Biais du répertoire T MP/A2-spécifique

Chez les individus  $A2^+$ , la réponse T CD8<sup>+</sup> dirigée contre le virus de l'influenza est dominée par des cellules T spécifiques du peptide MP<sub>58</sub> (GILGFVFTL) (Gotch et al., 1987). Le peptide MP<sub>58</sub> est « featureless », c'est-à-dire très enfoui dans la poche du CMH de classe I (Fig. 21). La plupart des cellules MP/A2-spécifiques expriment le segment génique V $\beta$ 17 (aussi appelé BV17), et leurs CDR3 $\beta$  présentent une séquence de résidus conservée, notamment une arginine en position 98 et une sérine en position 99 (Moss et al., 1991; Lehner et al., 1995). L'usage préférentiel du BV17 par les cellules MP/A2-spécifiques n'est pas observable pendant la réponse primaire chez des nouveaux-nés, mais apparaît au cours des premières années de la vie (Lawson, 2001). La structure d'un TCR BV17<sup>+</sup> complexé à MP/A2 a montré que la reconnaissance était médiée par des résidus uniques aux CDR1 et CDR2 du BV17, associés à l'arginine 98 et à la sérine 99 du CDR3 $\beta$  (Stewart-Jones et al., 2003) (Fig. 21). En particulier, l'arginine 98 de la boucle du CDR3 $\beta$  s'insère dans une encoche entre le peptide et l'hélice  $\alpha$ 2 du CMH, et constituerait ainsi une solution « unique » pour la reconnaissance de ce peptide enfoui dans le sillon du CMH.



Figure 21: Structure de l'interaction TCR-MP/A2 (Gras et al., 2008). Interface de l'interaction entre la chaîne  $\beta$  du TCR et le complexe MP/A2. Les CDR1 $\beta$  et 2 $\beta$  sont en rose, le CDR3 $\beta$  est en vert. Le peptide est représenté en jaune et le CMH en gris.

#### 2. Biais du répertoire T MelA/A2 spécifique

Au sein de tous les individus, environ 70% des lymphocytes T CD8 naïfs dirigés contre le complexe MelA/A2 expriment le segment génique V $\alpha$ 2 (aussi appelé AV2) (Lehner et al., 1995; Trautmann et al., 2002; Dietrich et al., 2003). La structure tridimensionnelle d'un TCR AV2<sup>+</sup> en complexe avec MelA/A2 a récemment été publiée (Cole et al., 2009). Elle révèle un rôle déterminant joué par le segment AV2 dans l'interaction du TCR avec le CMH, mais aussi avec le peptide (Fig. 22C). En particulier, le CDR1 $\alpha$  fixe le TCR à l'hélice  $\alpha$ 2 du CMH via l'arginine 28, et interagit fortement avec le peptide via la glutamine 31. La boucle du CDR1 $\alpha$  joue ainsi un rôle comparable aux boucles CDR3 dans d'autres structures TCR-pCMH, compte tenu de sa position centrale au-dessus de l'extrémité N-terminale du peptide MelA (Cole et al., 2009).





A. Position des CDR1 $\alpha$  et CDR2 $\alpha$  (légendés  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 respectivement) du TCR MelA/A2-spécifique en complexe avec MelA/A2. B. Position des CDR1 $\alpha$  et CDR2 $\alpha$  d'un TCR Tax/A2-spécifique en complexe avec Tax/A2. C et D. Interactions des résidus Arg28 et Gln31 du CDR1 $\alpha$  (segment génique AV2) avec les complexes MelA/A2 (C) et Tax/A2 (D).

Le segment génique AV2, qui est le seul possédant les résidus Arg28 et Gln31, est aussi exprimé par un TCR spécifique du peptide viral Tax présenté par le HLA-A2. Dans les deux structures TCR-pCMH, le CDR1 $\alpha$  codé par le AV2 occupe la même place inhabituelle au-dessus de la partie N-terminale du peptide et établit de nombreux contacts avec l'antigène (Fig. 22). Malgré les différences de chaînes  $\beta$  exprimées par les deux TCR, et les différences entre les séquences des peptides MelA (ELAGIGILTV) et Tax (LLFGYPVYV), le mode de fixation du CDR1 $\alpha$  est identique dans les deux structures, indiquant que le docking de ces TCR est dicté par le segment AV2. De plus, le TCR MelA /A2 spécifique contacte essentiellement la chaîne principale du peptide MelA, seulement 3 des 17 interactions peptidiques étant médiées par des chaînes latérales (Cole et al., 2009). Cette distribution inégale et inhabituelle suggère que ce TCR MelA/A2-spécifique soit moins sensible à des modifications de séquence peptidique qu'à des modifications de conformation dans le sillon du CMH.

#### 3. Modèle structural de l'antigénicité d'un complexe pCMH

Les caractéristiques conformationnelles du peptide présenté dans le sillon du CMH ont un impact sur la diversité du répertoire T spécifique (Turner et al., 2005; Turner et Carbone, 1998). L'équipe de Peter Doherty a proposé un modèle basé sur le degré de protrudance du peptide pour expliquer la réduction de diversité caractéristique des répertoires biaisés (Turner et al., 2006). D'après ce modèle, les peptides « featureless », c'est-à-dire très enfouis dans la poche du CMH (et donc présentant peu ou pas de chaînes latérales exposées au solvant) ressemblent fortement à des complexes pCMH du soi, et les cellules T susceptibles de les reconnaître auront été délétées par sélection négative dans le thymus (Fig. 23). Les peptides « featured » sont conventionnels, ils présentent une à trois chaînes latérales exposées au solvant, et peuvent être reconnus par un grand nombre de TCR différents. Les peptides protrudants sont des peptides longs (>12 résidus), qui doivent se courber pour rentrer dans le sillon du CMH de classe I, et qui pour cette raison empêchent le TCR de contacter les hélices  $\alpha$  du CMH. Seul un nombre restreint de lymphocytes T, exprimant une combinaison de CDR1, 2 et 3 particulière, peut s'accommoder de telles contraintes structurales, et le répertoire T spécifique de ces peptides protrudants est donc peu divers (Turner et al., 2006).



Figure 23: Bases structurales de la diversité d'un répertoire T pCMH-spécifique (D'après (Turner et al., 2006).

Cependant, ce modèle ne repose pas sur une mesure directe de la fréquence des cellules T naïves dirigées contre un complexe pCMH donné, mais sur l'évaluation de la diversité des réponses T Ag-spécifiques murines après infection *in vivo* par un virus transgénique porteur de l'épitope (Turner et al., 2006). Jusqu'à très récemment, la très faible fréquence des lymphocytes T pCMH-spécifiques dans le répertoire naïf a exclu toute possibilité d'analyse directe de l'antigénicité des complexes pCMH.

#### **IV. OBJECTIFS POURSUIVIS ET CONTEXTE SCIENTIFIQUE DE L'ÉTUDE**

La relation entre la structure d'un complexe pCMH et son antigénicité (que nous définissons comme sa capacité à être reconnu par une large population T dans le répertoire naïf) n'a pu être étudiée directement à cause de la très faible fréquence des cellules T naïve Ag-spécifiques. Chez la souris, l'étude des populations T naïves et de l'initiation de la réponse T était basée sur le transfert adoptif de nombres déterminés de cellules TCR transgéniques dans des receveurs histocompatibles (Jenkins et al., 2001; McHeyzer-Williams et Davis, 1995; Whitmire et al., 2006). Une telle approche indirecte avait permis d'estimer à 2.10<sup>-5</sup> la fréquence des précurseurs T CD8<sup>+</sup> dirigés contre un Ag murin H2-D<sup>b</sup>-restreint (Blattman et al., 2002). Chez l'homme, en revanche, aucune donnée n'était disponible au début de ce travail de thèse, à l'exception notable de l'étude de la population T MeIA/A2-spécifique. L'analyse des populations T dirigées contre cet Ag tumoral était rendue possible par l'extraordinaire antigénicité de ce complexe pCMH dans le répertoire T naïf (de l'ordre de 10<sup>-3</sup>) (Lehner et al., 1995; P. Dietrich et al., 2003; Trautmann et al., 2002).

Peu avant mon arrivée au laboratoire, l'analyse *ex vivo* du répertoire T naïf Ag-spécifique de souris non modifiées génétiquement a été rendue possible par le développement d'une nouvelle approche basée sur l'enrichissement immunomagnétique des cellules T dirigées contre des multimères de complexes pCMH fluorescents (Moon et al., 2009). Les premières études exploitant cette nouvelle stratégie ont révélé des variations de fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Obar et al., 2008) et CD4<sup>+</sup> (Moon et al., 2007) selon l'Ag considéré. Les mécanismes qui sous-tendent cette hétérogénéité de fréquence restent peu clairs, mais pourraient impliquer les processus d'expansion homéostatique périphérique, les sélections thymiques, et les caractéristiques structurales de l'Ag, notamment la protrudance du peptide dans la poche du CMH (Turner et al., 2006).

Dans ce contexte, les objectifs de mon travail de thèse étaient d'estimer *ex vivo*, chez des individus sains, la fréquence des lymphocytes T pCMH-spécifiques naïfs, et d'analyser les paramètres déterminant la taille de ces populations Ag-spécifiques. En particulier, la contribution des processus homéostatiques et des sélections thymiques dans l'antigénicité des complexes pCMH a pu être évaluée par une analyse comparative de la réactivité des répertoires T matures (au sein des PBMC) et immatures (dans le thymus). D'autre part, mon travail de thèse a pu bénéficier d'une collaboration bien établie avec l'équipe de D. Housset

(Institut de Biologie Structurale, à Grenoble) pour investiguer le rôle de la topologie de l'Ag dans sa capacité à interagir avec le répertoire T.

## RÉSULTATS

#### I. PRINCIPAUX OUTILS EXPÉRIMENTAUX

#### A. MONOMÈRES DE COMPLEXES PEPTIDE/CMH RECOMBINANTS

Parmi les méthodes d'analyse des populations lymphocytaires T d'une spécificité donnée, celle basée sur l'utilisation de complexes peptide/CMH oligomériques fluorescents permet le marquage direct des lymphocytes T via leur TCR. La détection des lymphocytes T spécifiques d'un Ag donné est ainsi indépendante des capacités fonctionnelles des lymphocytes, et peut être combinée à une analyse d'autres marqueurs phénotypiques.

La stratégie de production des complexes peptides/CMH recombinants a été mise au point par l'équipe d'Altman en 1996 (Altman et al., 1996). Dans un premier temps, les domaines extracellulaires des deux chaînes du HLA de classe I (chaîne lourde et β2-microglobuline) sont produites séparément sous forme de corps d'inclusion en bactérie. Les deux sous-unités sont ensuite renaturées en présence du peptide d'intérêt (Fig. 24). Le domaine extracellulaire de la chaîne lourde de la molécule HLA a été modifié à l'extrémité C-terminale par l'ajout d'un domaine de fixation de la biotine. Ainsi, les complexes monomériques sont ensuite biotinylés par l'enzyme BirA, spécifiquement sur la lysine contenue dans la séquence peptidique consensus. La biotinylation enzymatique offre deux avantages : le degré de biotinylation est contrôlé car une seule molécule de biotine est ajoutée à chaque complexe, et comme le site de biotinylation est le même pour chaque complexe antigénique les molécules peptide/CMH auront toutes la même orientation après oligomérisation sur la streptavidine.



Figure 24: Schéma de la stratégie de production d'oligomères fluorescents de complexes pCMH.

#### B. Tétramères et multimères de complexes peptide/CMH

Pour détecter des populations lymphocytaires T spécifiques d'un complexe pCMH donné, il est nécessaire de compenser la faible affinité de l'interaction TCR-ligand (de l'ordre de 1-50  $\mu$ M, Krogsgaard et Davis, 2005) par une augmentation de l'avidité de l'interaction. Pour ce faire, les molécules de pCMH peuvent être tétramérisées en présence de streptavidine qui possède quatre sites de fixation de la biotine. Pour étudier les populations T en cytométrie de flux, les monomères de complexes pCMH sont conjugués à de la streptavidine couplée à un fluorochrome. Selon le fournisseur de streptavidine fluorescente, chaque molécule de fluorochrome sera couplée à une seule ou à plusieurs molécules de streptavidine, et on construira ainsi des oligomères de complexes pCMH fluorescents dont les valences et donc les avidités s'échelonnent, en fonction du type de streptavidine fluorescente utilisé, du tétramère au multimère.

#### C. MUTANTS

Le co-récepteur CD8, exprimé à la surface des lymphocytes T CD8, interagit avec une région conservée du domaine  $\alpha$ 3 de la molécule de CMH de classe I (Salter et al., 1990) et contribue ainsi de manière peptide aspécifique à l'interaction du lymphocyte T avec le

complexe antigénique. Plusieurs groupes ont décrit des mutations dans le domaine  $\alpha$ 3 de la chaîne lourde du HLA-A2 permettant d'altérer ou d'abroger cette interaction et ainsi d'améliorer la spécificité du marquage par les oligomères de complexes pHLA-A2. Ainsi le mutant A245V (Alanine en position 245 remplacée par une Valine, également appelé A2m) présente une affinité réduite –mais non abolie- pour le CD8 (Bodinier et al., 2000; Neveu et al., 2006), tandis que le double mutant D227K / T228A (appelé CD8null) n'interagit plus du tout avec le CD8 (Choi et al., 2003; Pittet et al., 2003). Dans tout ce travail de thèse, et à moins que le contraire ne soit précisé, ce sont des complexes pCMH A245V (A2m) qui ont été utilisés.

### D. TECHNIQUE D'ENRICHISSEMENT IMMUNOMAGNÉTIQUE POUR LA DÉTECTION ET QUANTIFICATION DE POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES RARES

L'objectif de ce travail de thèse était d'estimer *ex vivo* la fréquence des lymphocytes T spécifiques de déterminants viraux ou tumoraux restreints par le HLA-A\*0201 au sein du compartiment T naïf, c'est-à-dire n'ayant jamais rencontré son Ag. À l'exception des populations T spécifiques de MelA/A2, qui sont présentes dans le sang périphérique des individus sains A2<sup>+</sup> à des fréquences exceptionnellement élevées (de l'ordre de 10<sup>-3</sup> au sein de la population T CD8 naïve), les populations naïves dirigées contre d'autres Ag tumoraux ou viraux immunodominants n'ont pu être étudiés chez l'homme du fait de leur rareté. Pour enrichir les populations spécifiques d'un complexe pCMH donné et ainsi contourner le problème de la faible fréquence des cellules T naïves, nous avons développé une technique d'enrichissement immunomagnétique, utilisant la technologie des oligomères de complexes pCMH et basée sur une stratégie mise au point chez la souris par l'équipe de Mark Jenkins (Moon et al., 2007, 2009) peu avant mon arrivée au laboratoire.

Brièvement, un échantillon de PBMC contenant des lymphocytes T naïfs d'intérêt est incubé en présence d'oligomères de complexes pCMH fluorescents (Fig. 25). Les cellules spécifiques du complexe pCMH sont marquées. Après un lavage permettant d'éliminer l'excès d'oligomère fluorescent, l'échantillon est incubé en présence de billes magnétiques recouvertes d'anticorps dirigés contre le fluorochrome de l'oligomère. Les cellules fixées aux oligomères sont alors enrichies par aimantation. Classiquement, à partir d'un échantillon de 10<sup>8</sup> PBMC, environ 500 000 cellules sont obtenues après un tel tri positif. Ces cellules contiennent les lymphocytes T spécifiques de l'oligomère d'intérêt, qui peuvent alors être analysés pour l'expression d'autres marqueurs phénotypiques et dénombrés par cytométrie en flux (Fig. 26). On peut souligner ici que l'analyse directe de la totalité des 10<sup>8</sup> PBMC ne

permet pas d'identifier formellement des événements rares, principalement du fait de l'augmentation importante du bruit de fond associée à l'analyse d'un très grand nombre de cellules.



## Figure 25: Stratégie d'enrichissement immunomagnétique et d'analyse phénotypique *ex vivo* des cellules marquées par un oligomère de pCMH fluorescent.

À l'issue de l'enrichissement, les cellules peuvent également être isolées à l'aide d'un trieur de cytométrie en flux et amplifiées *in vitro*.



Figure 26: Stratégie de fenêtrage des événements acquis après un enrichissement en cellules MelA/A2<sup>+</sup> réalisé sur 10<sup>8</sup> PBMC frais.

Après une première « gate » sélectionnant les lymphocytes sur la base de leurs taille et granulométrie, les cellules Dump<sup>+</sup> sont exclues de l'analyse tandis que les CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> sont analysées pour le marquage par le multimère de complexes pCMH. Le canal du Dump correspond aux événements positifs pour l'un au moins des marquages suivants : 7-AAD (cellules mortes), CD14 (monocytes), CD16 (cellules NK) ou CD19 (lymphocytes B).

Cette technique d'enrichissement permet ainsi de détecter des populations rares, comme les précurseurs T d'une spécificité antigénique définie. La figure 27 présente quelques exemples d'enrichissements immunomagnétiques : bien que peu ou pas détectables avant l'enrichissement, les lymphocytes T oligomère<sup>+</sup> ont pu être détectés chez tous les donneurs pré immuns après enrichissement.



Figure 27: Exemples d'enrichissements en lymphocytes T spécifiques de différents épitopes immunodominants et A2-restreints.

Les lymphocytes Dump- CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> et marqués par l'un des oligomères apparaissent soit avant (ligne du haut, acquisition de 0,5.10<sup>6</sup> PBMC), soit après enrichissement immunomagnétique à partir de 10<sup>8</sup> PBMC de donneurs sains (acquisition de la totalité de la fraction enrichie), non-porteurs de mélanomes et séronégatifs pour le VHC, le VIH ou le HCMV. Les % de cellules oligomère<sup>+</sup> sont indiqués.

#### 1. Spécificité du marquage par les oligomères de complexes pCMH

Une série d'expériences a été réalisée pour valider cette technique, nouvelle au laboratoire.

#### 1.1. Doubles enrichissements

La technique décrite précédemment peut servir à enrichir simultanément les populations T spécifiques de deux complexes pCMH distincts, si ceux-ci sont couplés à deux fluorochromes différents et si l'on dispose des billes magnétiques spécifiques de chacun des deux fluorochromes. L'analyse cytométrique des cellules Dump<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> après un double enrichissement révèle que le marquage par les oligomères est bien dépendant du peptide *ex vivo* (Fig. 28).



Figure 28: Doubles enrichissements en cellules pCMH-spécifiques.

Marquages des cellules Dump<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> avec des complexes pCMH oligomérisés sur des streptavidines couplées à la PE ou à l'APC, après un enrichissement simultané des cellules marquées par les deux oligomères. Les nombres absolus de cellules Ag-spécifiques détectées restent identiques lorsque les fluorochromes des streptavidines sont intervertis (non montré).

#### 1.2. Marqueurs moléculaires

De nombreuses équipes ont documenté des biais moléculaires dans certains répertoires T, et notamment dans les répertoires spécifiques de MelA/A2 et MP/A2, qui présentent un usage préférentiel des segments de TCR AV2 et BV17, respectivement (Moss et al., 1991; Lehner et al., 1995; Dietrich et al., 2003; Trautmann et al., 2002). En accord avec ces études, environ 80% des lymphocytes marqués par l'oligomère MelA/A2 étaient aussi marqués par un Ac anti-AV2, et environ 50% des lymphocytes MP/A2<sup>+</sup> étaient BV17<sup>+</sup> (Fig. 29).



Figure 29: Usage préférentiel des régions de TCR AV2 et BV17 par les populations T CD8<sup>+</sup> marquées par les oligomères MelA/A2 et MP/A2, respectivement.

Les résultats ont été obtenus après enrichissement d'échantillons de  $10^8$  PBMC frais de donneurs A2<sup>+</sup> sains, non porteurs de mélanomes et séronégatifs pour le VHC, mais séropositifs pour l'influenza. Les % de cellules oligomère+ et AV2<sup>+</sup> ou BV17<sup>+</sup> sont indiqués.

#### 1.3. Tests fonctionnels de lignées T oligomère<sup>+</sup> in vitro

Pour obtenir des lignées T Ag-spécifiques, les cellules T CD8 oligomère<sup>+</sup> ont été « sorties » par un FACS Aria (BD Immunocytometry Systems) à l'issue d'un enrichissement

immunomagnétique (Fig. 25: schéma général du tri). Les cellules (typiquement au nombre de 50 à 500) ont ensuite été amplifiées *in vitro* de façon non spécifiques en présence de cellules nourricières irradiées (PBMC et lignées B-EBV), d'un activateur polyclonal (la phytohémagglutinine A, 1ug/ml), et d'IL-2 (150 UI/ml). Ce « feeder » apporte les facteurs de croissance nécessaires à l'expansion des lymphocytes T, sans induire de biais de cultures (David-Ameline et al., 1996). Les lignées T ont été maintenues en milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal, 1 mM de glutamine et 150 UI/ml d'IL-2. Après 3 semaines de culture, la pureté et la spécificité des lignées T au repos ont été vérifiées par marquage d'oligomère de complexe pCMH (voir Fig. 50A, p.98). Pour exclure l'éventualité que les lignées T ne soient constituées que d'un nombre très limité de clonotypes privilégiés au cours de l'amplification, la polyclonalité des populations a été vérifiée à l'aide d'un panel d'Ac anti-Vß (voir Fig. 50B, p.98). Pour tester de manière fonctionnelle la spécificité antigénique des lignées T obtenues, les cellules T ont été analysées par marquage intracellulaire des cytokines à la suite d'une incubation avec des cellules cibles chargées en peptide de manière exogène (cellules HLA-A2<sup>+</sup> TAP-déficientes). Les lymphocytes T enrichis et « sortis » à l'aide d'un oligomère donné produisent des cytokines et dégranulent en réponse au peptide d'intérêt, mais pas à un peptide contrôle, indiquant que les cellules T oligomères<sup>+</sup> présentent une spécificité antigénique adéquate (Fig. 30).



Figure 30: Analyse fonctionnelle d'une lignée T CD8<sup>+</sup> triée par le multimère MelA/A2.

Les cellules cultivées *in vitro* (pureté en cellules oligomères<sup>+</sup> > 90%, non montré) ont été incubées pendant 5h avec des cellules cibles  $A2^+$  chargées avec le peptide MelA ou un peptide contrôle, et testées pour leur production intracellulaire d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ . Les % de cellules TNF $\alpha^+$  et IFN $\gamma^+$  sont indiqués.

#### 2. Qualité des estimations de fréquences des cellules T rares et seuil de détection

La sensibilité et la fiabilité de la technique d'enrichissement immunomagnétique des cellules oligomères<sup>+</sup> ont enfin été validées par (i) l'estimation de la fréquence résiduelle après

La sensibilité et la fiabilité de la technique d'enrichissement immunomagnétique des cellules oligomères<sup>+</sup> ont enfin été validées par (i) l'estimation de la fréquence résiduelle après déplétion en cellules oligomères<sup>+</sup> (Fig. 31), (ii) la quantification de clones peptide/A2 spécifiques dilués en série dans 100 millions de PBMC (Fig. 32) et (iii) la comparaison des fréquences de cellules oligomère<sup>+</sup> estimées dans les PBMC avant ou après enrichissement immunomagnétique chez des donneurs séropositifs (Fig. 33). Cette dernière expérience permet en outre de déterminer un seuil de détection des cellules spécifiques d'un complexe pCMH donné. Nous considérons que nous pouvons identifier formellement jusqu'à 10 cellules Ag-spécifiques au sein de 10<sup>8</sup> PBMC. La fréquence seuil est donc de l'ordre de 10<sup>-6</sup> au sein des lymphocytes T CD8 naïfs.



Figure 31: Estimation de la fréquence résiduelle après déplétion en cellules oligomères<sup>+</sup>.

Marquage du multimère MP/A2 au sein de la fraction cellulaire Dump<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> d'un donneur séropositif pour l'influenza (analyse de 0,5.10<sup>6</sup> PBMC). Les résultats sont indiqués pour un marquage sur des PBMC totaux (panel de gauche), sur des PBMC déplétés par le multimère MelA/A2 (panel du centre), et sur des PBMC déplétés par le multimère MP/A2 (panel de droite).



Figure 32: Sensibilité et efficacité de l'enrichissement immunomagnétique.

Un clone  $A2^+$  spécifique de MelA/A2 a été dilué en série dans  $10^8$  PBMC d'un donneur  $A2^-$  avant enrichissement avec le multimère MelA/A2. Le rendement de récupération des cellules  $A2^+$  multimère<sup>+</sup> était autour de 80% sur une gamme de fréquence de quatre log.



Figure 33: Fréquences des cellules oligomère<sup>+</sup> estimées dans les PBMC avant ou après enrichissement immunomagnétique chez des donneurs A2<sup>+</sup> séropositifs pour le VHC, le HCMV ou le virus de l'influenza.

Chez ces donneurs en effet, la fréquence de lymphocytes Ag-spécifiques est élevée et peut être évaluée sans enrichissement préalable.

# **II.** ARTICLE 1 : IMPACT OF TCR REACTIVITY AND HLA PHENOTYPE ON NAIVE CD8 T CELL FREQUENCY IN HUMANS.

<u>François LEGOUX</u>, Emilie DEBEAUPUIS, Klara ECHASSERIEAU, Henri DE LA SALLE, Xavier SAULQUIN, Marc BONNEVILLE.

Journal of Immunology, 2010, 184 (12) : 6731-8.

Dans cette étude, nous mettons en œuvre la technique d'enrichissement immunomagnétique précédemment décrite pour quantifier *ex vivo* les précurseurs T spécifiques de différents peptides immunodominants, tous restreints au HLA-A\*0201, dans le sang périphérique d'individus exprimant ou non le HLA de restriction. Les épitopes inclus dans l'étude sont répertoriés dans le tableau 2.

Peptide	Séquence	Origine	Références
MelA <sub>27</sub>	ELAGIGILTV	Mélanome	Kawakami et
			Rosenberg, 1997
PGT <sub>178</sub>	LLAGIGTVPI	Prostaglandin	Dutoit et al., 2002
		Transporter	
NS3 <sub>1073</sub>	CINGVCWTV	VHC	Neveu et al., 2008
pp65 <sub>495</sub>	NLVPMVATV	HCMV	Trautmann et al., 2005
Gag <sub>77</sub>	SLYNTVATL	VIH	Day et al., 2001;
			Johnson et al., 1991
MP <sub>58</sub>	GILGFVFTL	Influenza	Altman et al., 1996

 Tableau 2 : épitopes A2-restreints inclus dans l'étude.

Bien que les individus inclus dans l'étude soient non porteurs de mélanome et séronégatifs pour le VHC, le HIV et le HCMV, des lymphocytes T exprimant des marqueurs mémoires (i.e. CD45RO<sup>+</sup>CD27<sup>lo</sup>CD11a<sup>hi</sup>) spécifiques des épitopes viraux ou tumoraux étudiés ont été détectés chez chaque donneur. Ces cellules mémoires, qui correspondent probablement à des cellules activées par réactivité croisée vis-à-vis d'un autre Ag (environnemental ou non), ont pu subir une expansion variable d'un donneur à l'autre et d'un Ag à l'autre suite à leur activation, et peuvent donc introduire un biais dans notre analyse des fréquences de précurseurs Ag-spécifiques. Pour réduire ce biais, nous avons focalisé notre

étude sur les lymphocytes T naïfs, c'est-à-dire présentant le phénotype CD45RO<sup>-</sup> CD27<sup>hi</sup> CD11a<sup>lo</sup> (De Rosa et al., 2001).

Les principaux résultats de cette étude sont résumés ici :

- Chez les donneurs A2<sup>+</sup>, les fréquences de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques d'un Ag donné sont peu variables d'un individu à l'autre. Cette observation, bien qu'en accord avec une étude similaire réalisée chez la souris (Obar et al., 2008), était moins attendue chez l'homme compte tenu de l'hétérogénéité des phénotypes HLA.
- Les fréquences de précurseurs naïfs sont très variables selon la spécificité antigénique considérée. Elles s'échelonnent sur une gamme de deux log allants de 5.10<sup>-4</sup> (cellules spécifiques de MelA/A2) à 5.10<sup>-6</sup> (cellules spécifiques de Gag/A2) au sein des cellules T CD8<sup>+</sup> naives.
- 3. Des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques de tous les complexes antigéniques étudiés ont été détectés chez tous les donneurs A2<sup>-</sup>. Ces populations Ag-spécifiques présentent les mêmes biais de répertoire, des TCR d'affinités similaires et les mêmes caractéristiques fonctionnelles que leurs homologues chez les donneurs A2<sup>+</sup>.
- 4. L'expression de l'allèle de restriction a un impact variable sur la fréquence de lymphocytes T spécifiques naïfs suggérant une contribution variable des sélections positive et négative sur la fréquence de cellules Ag spécifiques.
- 5. La hiérarchie des fréquences est conservée entre les donneurs A2<sup>+</sup> et A2<sup>-</sup> (n=5, r<sup>2</sup>=0.94, p=0.017): les cellules naïves spécifiques de MelA/A2 et PGT/A2 sont les plus fréquentes, celles spécifiques de pp65/A2 et Gag/A2 sont les moins fréquentes, suggérant que certains complexes pCMH seraient plus facile à reconnaître que d'autres.
- 6. En accord avec cette dernière observation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> naïfs spécifiques de tous les complexes A2/peptide étudiés ont également été détectés chez tous les donneurs et la hiérarchie de fréquence de ces cellules est la même qu'au sein des compartiments CD8 des donneurs A2<sup>+</sup> ou A2<sup>-</sup> (n=50, r<sup>2</sup>=0.735, p<0.001).</p>

En conclusion, cette étude établie une mesure directe de la fréquence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques de différents complexes pA2 immunodominants, et suggère que la taille du répertoire pré immun est déterminée en partie par les contraintes de sélections thymiques et en partie par le degré d'antigénicité du complexe pCMH, qui est directement lié à la réactivité inhérente du répertoire de TCR. D'autre part, bien que des études précédentes aient proposé que les fréquences de précurseurs régulent l'amplitude et l'immunodominance des réponses T chez la souris (Obar et al., 2008), nos données indiquent qu'une réponse T A2-restreinte immunodominante n'est pas toujours associée à une fréquence élevé de cellules spécifiques dans le répertoire naïf. En particulier, bien que les cellules CD8<sup>+</sup> pp65/A2-spécifiques puissent constituer une fraction importante du répertoire T anti-viral au cours d'une infection au HCMV, les fréquences de ces cellules dans le compartiment CD8<sup>+</sup> naïf des individus A2<sup>+</sup> ne sont pas supérieures à celles trouvées dans le compartiment CD4<sup>+</sup>, ou chez des donneurs n'exprimant pas l'allèle de restriction.

### Impact of TCR Reactivity and HLA Phenotype on Naive CD8 T Cell Frequency in Humans

#### François Legoux,\* Emilie Debeaupuis,\* Klara Echasserieau,\* Henri De La Salle,<sup>†</sup> Xavier Saulquin,\*<sup>,1</sup> and Marc Bonneville\*<sup>,1</sup>

The impact of MHC phenotype on the shaping of the peripheral naive T cell repertoire in humans remains unknown. To address this, we compared the frequency and antigenic avidity of naive T cells specific for immunodominant self-, viral, and tumor Ags presented by a human MHC class I allele (HLA-A\*02, referred to as A2) in individuals expressing or not this allele. Naive T cell frequencies varied from one Ag specificity to another but were restrained for a given specificity. Although A2-restricted T cells showed similar repertoire features and antigenic avidities in  $A2^+$  and  $A2^-$  donors, A2 expression had either a positive, neutral, or negative impact on the frequency of A2-restricted naive CD8 T cells, depending on their fine specificity. We also identified in all donors CD4 T cells specific for A2/peptide complexes, whose frequencies were not affected by MHC class I expression, but nevertheless correlated with those of their naive CD8 T cell counterparts. Therefore, both selection by self-MHC and inherent TCR reactivity regulate the frequency of human naive T cell precursors. Moreover this study also suggests that T cell repertoire shaping by a given self-MHC allele is dispensable for generation of immunodominant T cell responses restricted by this particular allele. *The Journal of Immunology*, 2010, 184: 6731–6738.

 $\blacksquare$  he 10<sup>15</sup> TCRs that can be theoretically generated through somatic recombination of TCR V(D)J segments is well above the estimated  $25-100 \times 10^6$  distinct TCRs that actually make up the peripheral T cell repertoire in a given individual (1). This severe attrition of peripheral TCR diversity is due, at least in part, to both thymic and peripheral selection processes. In particular, T cell precursors undergo both "positive" and "negative" intrathymic selection processes that allow generation of a functional yet self-tolerant T cell repertoire. Although "positive selection" favors maturation of developing T cells with intermediate avidity for self-peptide/MHC (pMHC), "negative selection" deletes or inactivates strongly self-reactive thymocytes (2-4). How precisely the peripheral T cell repertoire is shaped by positive and negative selection remains debated (5-7). Consistent with the view that positive selection biases the peripheral repertoire toward recognition of pMHC complexes related to those encountered in the thymus, T cells expressing a given transgenic TCR are selected in vitro and in vivo by a single or a restricted set of pMHC complexes only (8–10). Along this line, a single pMHC complex can positively select a diverse CD8 T cell repertoire,

which is primarily restricted by the selecting H-2 allele (11). These results suggest a dominant role played by positive selection in imprinting preferential Ag recognition in the context of self-MHC alleles, a phenomenon also referred to as "self-MHC restriction." However, seemingly opposite conclusions were previously drawn from analysis of CD4 T cells selected by a single pMHC class II complex. In the latter case, the diverse CD4 repertoire selected by the transgenic pMHC complex was in large part deleted, owing to its extensive cross-reactivity against self- and allogeneic pMHC, consistent with a major role played by negative selection in shaping the T cell repertoire (12–14). Besides thymic selection, peripheral homeostatic processes, which favor survival or expansion of naive T cells able to establish continuous low-affinity interactions with self-MHC, could contribute to self-MHC focusing and repertoire remolding as well (15, 16).

The paucity of naive T cells specific for a given Ag has hampered assessment of the overall impact of thymic selection and MHC background on the MHC restriction of peripheral T cells in nongenetically manipulated outbred individuals. Ex vivo analysis of the naive-specific T cell repertoire in a nontransgenic setting has recently been made possible, thanks to novel approaches based on either immunomagnetic enrichment for specific T cells using soluble fluorescent multimers of defined pMHC complexes (17–20) or use of libraries of amplified naive T cells (21). One of such studies suggested that expression of a given murine MHC class II allele had a limited impact on the frequency of naive T cells restricted by this allele (22). However, it strongly affected the T cell repertoire quality, mainly through negative selection of self-reactive clones. Whether or not similar observations apply to T cells from other species or restricted by other MHC classes remains unknown.

In this study, we exploited a pMHC multimer-based sorting approach to analyze the impact of expression of a given HLA class I allele on the frequency and quality of peripheral blood naive CD8 T cells directed against several Ag restricted by this particular HLA allele. Our results indicate that expression of a defined HLA allele has a predominantly positive, although heterogeneous, impact on the frequency of naive CD8 T cells restricted by this allele, depending on the peptide Ag studied. Moreover, we provide evidence that

<sup>\*</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 892, Université de Nantes, Nantes; and <sup>†</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 725, Strasbourg, France

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>X.S. and M.B. are cosenior authors.

Received for publication January 28, 2010. Accepted for publication April 12, 2010.

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA (R05121GS) and the Agence Nationale de la Recherche (A05130GS) and by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Université de Nantes.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Xavier Saulquin or Dr. Marc Bonneville, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 892, Université de Nantes, Institut de Recherche Therapeutique Université de Nantes, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 1, France. E-mail addresses: xavier. saulquin@inserm.fr or bonnevil@nantes.inserm.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this paper: HCMV, human CMV; HCV, hepatitis C virus; ns, not significant; pMHC, peptide/MHC.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

6732

naive CD8 T cell precursor frequency is regulated by the crossreactivity level for the corresponding Ags of T cells selected by weakly or unrelated pMHC complexes.

#### Materials and Methods

#### Antibodies

PerCP-Cy5.5–conjugated anti-CD14, CD16, and CD19 (BD Biosciences, San Jose, CA); Amcyan-conjugated anti-CD3 (BD Biosciences); Pacific Blue-conjugated anti-CD8; allophycocyanin- or FITC-conjugated anti-CD4; APC-H7–conjugated anti-CD27; FITC-conjugated anti-CD4; APC-H7–conjugated anti-CD45RO; allophycocyanin-conjugated anti-IFN- $\gamma$ ; PE-conjugated anti-TNF- $\alpha$ ; FITC-conjugated anti-CD107; FITCconjugated anti-IL-2; and FITC-conjugated anti-BV17 Abs were purchased from BD Biosciences. Anti-AV2 Ab was provided by D. Speiser (Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne, Switzerland) and conjugated to AlexaFluor 647 using a labeling kit (Molecular Probes, Eugene, OR).

#### Peptides and pMHC multimers

The following HLA-A\*0201-restricted peptides were purchased from Proimmune: MelA27- (melanoma Ag, ELAGIGILTV), PGT178 (human PG transporter, LLAGIGTVPI), NS31073 (hepatitis C virus [HCV], CINGVCWTV), pp65495 (human CMV [HCMV], NLVPMVATV), Gag77 (HIV-1, SLYNTVATL), MP58 (human influenza virus, GILGFVFTL), p800 (MelA<sub>27</sub> variant, ELAGWGILTV), and p21 (NS31073 variant, CISGVCWTV). Soluble pMHC monomers were synthesized as described previously (23). HLA-A\*0201 H chains used in this study carried mutations in the  $\alpha$ 3 domain that either reduce (A245V, referred to as multimers) (23, 24) or abrogate (D227K andT228A, referred to as CD8-null multimers) (25, 26) CD8 binding to MHC class I. As previously described, the 245V mutants bind to both low- and high-affinity T cell clones irrespective of their valency but show decreased background binding to irrelevant CD8 T cells at high valencies (unlike wild-type pMHC multimers) (23). By contrast, the dual mutants pMHC fluorescent multimers bind to highaffinity T cells (i.e., expressing CD8-independent TCRs) only at low valencies but stain both high- and low-affinity T cells at high valencies (24, 27). In this study, we have used pMHC oligomers of low valencies multimerized with either PE- or allophycocyanin-labeled streptavidin (Prozyme [Hayward, CA] and Invitrogen [Carlsbad, CA], respectively) at a molar ratio of 4:1.

#### Donor samples

Cytapheresis samples were obtained from donors seronegative for HCMV, HCV, and HIV and presumably not at risk for infection. Blood samples from TAP-deficient donors were also included in this study. HLA class I genotyping was performed by Etablissement Français du Sang (Nantes, France).

#### Multimer-based enrichment protocol

PBMCs were obtained by Ficoll density gradient centrifugation (LMS, Eurobio, Les Ulis, France). A total of 108 freshly isolated PBMCs were incubated with 200 µl PE-conjugated multimers (10 µg/ml) for 30 min at room temperature and then washed with 15 ml ice-cold sorter buffer (PBS plus 0.5% BSA plus 0.2% EDTA). In some cases, PE- and allophycocyaninconjugated multimers were added together at this step. The multimer-stained cells were then enriched as described by Moon et al. (18) using anti-PE Ab-coated immunomagnetic beads. The resulting enriched fractions were stained with anti-CD14, -CD16, -CD19, -CD3, -CD4, -CD8, -CD45RO, -CD11a, -CD27, -BV17, or -AV2-labeled mAb and 7-aminoactinomycin D (BD Biosciences). Stained samples were then collected on a Canto II flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Counting beads (Life Technologies, Rockville, MD) were used to make sure that the entire cell sample had been collected. The total number of multimer-positive naive CD8 or CD4 T cells was divided by the total number of naive CD8 or CD4 T cells within 10<sup>8</sup> PBMCs to calculate the frequency of Ag-specific naive T cells.

#### Cell sorting

To obtain Ag-specific T cell lines, multimer-positive CD4 or CD8 T cells were sorted by an Aria flow cytometer (BD Immunocytometry systems) following multimer-based enrichment. Cells were then expanded in vitro under nonspecific conditions using rIL-2 (150 UI/ml), leukoagglutinin (1  $\mu$ g/ml), irradiated PBMCs, and B lymphoblastoid cells as described previously (28). T cell lines were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 1 mM L-glutamine, and 150 IU/ml rIL-2. Purity and specificity of T cell lines were checked by multimer staining and functional assays. Ag-specific CD4 or CD8 T cell clones were obtained from these T cell lines by limiting dilution as described previously.

#### Functional assays

For intracellular cytokine staining,  $3 \times 10^5$  lymphocytes were incubated with TAP-deficient HLA-A\*0201–positive T2 cells loaded with 10  $\mu$ M peptides (E:T ratio: 1:1). Protein-secretion inhibitor brefeldin A (1 mM) was added after 2 h of incubation. Intracellular staining assays were performed as described previously (29).

For degranulation assays, anti-CD107 Abs were added to T cells at the beginning of the incubation time with T2 cells loaded with peptides.

#### Statistical analysis

Data were analyzed, and  $\log_{10}$  regressions calculated using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad, San Diego, CA). Two-tailed unpaired *t* tests (95% confidence interval) were performed to compare frequencies of naive Ag-specific T cells. Two-tailed, nonparametric Mann-Whitney tests (95% confidence interval) were performed to compare data distributions: phenotypes of Ag-specific T cells in seronegative donors (*n* = 10) and percentage of high-avidity naive T cells among Ag-specific naive T cells.

#### Results

#### Analysis of CD8 T cells specific for defined pMHC complexes in naive donors

The features of CD8 T cells specific for viral and tumor Ag restricted by the common HLA-A\*0201 allele (referred to as A2) were studied within PBLs from "naive" (i.e., healthy and seronegative) individuals expressing or not this MHC allele. We selected the following A2-restricted epitopes with previously reported immunodominance: MelA<sub>27</sub> (a melanoma-derived Ag) (30), PGT<sub>178</sub> (a MelA<sub>27</sub>related endogenous epitope derived from the PG transporter) (31), NS3<sub>1073</sub> (29), pp65<sub>495</sub> (32), Gag<sub>77</sub>, and MP<sub>58</sub> (33) derived, respectively, from HCV, HCMV, HIV, and influenza virus.

The ex vivo frequency of specific CD8 PBLs was assessed after immunomagnetic enrichment using soluble fluorescent multimers of A2/peptide complexes ("A2 multimers") with reduced nonspecific binding to CD8 T cells (Fig. 1) (23, 24). Although barely or undetectable within unsorted PBLs from most donors, A2 multimer<sup>+</sup> T cells were detected in all A2<sup>+</sup> individuals after enrichment, irrespective of donor serological status (Fig. 2A and data not shown). Proper Ag specificity of A2 multimer<sup>+</sup> T cells was supported by their binding to relevant but not irrelevant A2/peptide multimers (Fig. 2B), by their activation by relevant Ag peptides only (Supplemental Fig. 1A), and by their TCR repertoire features. In particular, in line with previous studies reporting biased TCR AV2 and BV17 usage by MelA27- and MP58-specific T cells respectively (34, 35), ~80% of A2/MelA27<sup>+</sup> PBLs were stained by AV2-specific mAb, and ~50% of A2/MP<sub>58</sub><sup>+</sup> PBLs were BV17<sup>+</sup> (Supplemental Fig. 1B). Unexpectedly, although recognition of PGT<sub>178</sub> by some MelA<sub>27</sub>-specific T cell clones was previously described (31), the corresponding A2/PGT<sub>178</sub> and A2/MelA<sub>27</sub> multimers stained distinct PBL subsets with limited or no overlap (Fig. 2B and data not shown). Finally, sensitivity and accuracy of the pMHC-based enrichment process were validated by 1) quantitation of A2-specific T cell clones serially diluted within  $10^8$  PBLs (Supplemental Fig. 2A), 2) estimation of the residual frequency of A2 multimer<sup>+</sup> PBLs after immunomagnetic pMHC-based depletion (Supplemental Fig. 2B), and 3) direct comparison of the frequency of A2 multimer<sup>+</sup> cells estimated in PBLs before and after enrichment in seropositive donors (Supplemental Table I).

## Heterogeneous frequencies of A2-restricted naive CD8 T cells against self- and viral Ags in $A2^+$ donors

The overall average frequencies of specific subsets within CD8 T cells from A2<sup>+</sup> naive donors ranged from  $5 \times 10^{-6}$  for Gag<sub>77</sub>-specific to  $5 \times 10^{-4}$  for MelA<sub>27</sub>- and PGT<sub>178</sub>-specific T cells.



**FIGURE 1.** Multimer-based enrichment strategy. A2 multimer enrichment was performed on  $10^8$  freshly isolated PBMCs. Dump<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup> gated events were analyzed for CD8 or CD4 expression. A2 multimer<sup>+</sup> events were analyzed within either CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> subsets. The frequency of naive A2 multimer<sup>+</sup> T cells was further assessed within the CD45R0<sup>-</sup>CD11a<sup>lo</sup>CD27<sup>hi</sup> subset. A representative staining obtained following MelA<sub>27</sub>-multimer enrichment is shown. The dump channel corresponds to pooled events positive for either 7-aminoactinomycin D (dead cells), CD19 (B cells), CD16 (NK cells), or CD14 (monocytes).

They also varied for a given Ag specificity from one individual to another, more particularly within the least frequent T cell subsets (Fig. 3A). Although donors included in our study were all preimmune individuals for the tested Ag, specific memory cells were found in every case (Fig. 3B). Because memory cells may have been subject to peripheral expansion, which can introduce a bias into the analysis of Ag-specific T cell frequencies, we specifically tracked naive subsets, as defined by their CD45RO<sup>-</sup>CD11a<sup>lo</sup> CD27<sup>hi</sup> phenotype (Fig. 1) (36). Although the frequencies of A2-restricted naive CD8 T cells still showed up to a 100-fold difference from one Ag to another in A2<sup>+</sup> donors, they were highly conserved for a given Ag specificity within A2<sup>+</sup> donors, irrespective of their other HLA alleles (Fig. 3*C*). Therefore, the size of A2-restricted T cell subsets seems tightly constrained and barely or not affected by T cell alloreactivity for non-A2 alleles.

#### A2-restricted CD8 T cells from $A2^-$ individuals show generally lower frequencies but similar functional features than their $A2^+$ counterparts

A2 multimer<sup>+</sup> CD8 T cells were detected in all A2<sup>-</sup> donors as well at frequencies that followed the same hierarchy than in A2<sup>+</sup> donors (i.e., MelA<sub>27</sub> = PGT<sub>178</sub> > NS3<sub>1073</sub> > pp65<sub>495</sub> = Gag<sub>77</sub>) (n = 5;  $r^2 = 0.94$ ; p = 0.017) (Fig. 4). Relevance of A2 multimer binding to HLA-A2<sup>-</sup> T cells was supported by both repertoire and functional

analyses. Indeed, HLA-A2<sup>-</sup> naive CD8 T cells stained by MelA<sub>27</sub>and MP<sub>58</sub>-loaded A2 multimers had similarly biased expression of TCR AV2 and BV17 regions, respectively, than their HLA-A2<sup>+</sup> counterparts (Fig. 5*A*). Moreover, sorted NS3<sub>1073</sub>- and MelA<sub>27</sub>specific T cells from A2<sup>-</sup> donors recognized in vitro A2<sup>+</sup> target cells loaded with relevant but not irrelevant peptides in cytotoxicity and cytokine production assays (Fig. 5*B* and data not shown).

Although the frequencies of  $pp65_{495}$ - and  $Gag_{77}$ -specific subsets were similar in all donors, irrespective of their A2 haplotype, they were 3–10 times higher in A2<sup>+</sup> than in A2<sup>-</sup> individuals for NS3<sub>1073</sub>-, MelA<sub>27</sub>-, and PGT<sub>178</sub>-specific T cells (Fig. 4). Therefore, A2 expression has a heterogeneous impact on the size of A2-restricted T cells subsets, depending on their fine Ag specificity.

Because the alloreactive and self-restricted T cell repertoire might show qualitative differences, notably in terms of avidity (37), this parameter was further studied using engineered A2 multimers unable to engage CD8 coreceptors (referred to as "CD8-null" A2 multimers), which bind to high- but not low-avidity CD8 T cell subsets (25, 26). The percentage of MelA<sub>27</sub>-, PGT<sub>178</sub>-, and NS3<sub>1073</sub>-specific T cells stained by CD8-null A2 multimers were similar in all donors, irrespective of their A2 phenotype (Fig. 5*C*). These results are in line with a previous study showing similar proportions of high-avidity T cells within MelA<sub>27</sub>-specific T cell clones derived from A2<sup>+</sup> versus A2<sup>-</sup> individuals (38) and extend



**FIGURE 2.** Detection of A2 multimer<sup>+</sup> T cells after multimer-based enrichment. *A*, Representative contour plots of A2 multimer versus CD3 on Dump<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-gated events. Results are shown either before (*top row*, analysis of  $5 \times 10^5$  cells) or after (*bottom row*, analysis of the whole sample) multimer-based enrichment of  $10^8$  PBMCs from A2<sup>+</sup> donors seronegative for HCV, HIV, and HCMV. Frequencies of multimer<sup>+</sup> cells are indicated. *B*, Representative stainings with A2 multimers multimerized with PE- and APC-labeled streptavidin and loaded with either distinct or identical antigenic peptides within Dump<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> gated cells after simultaneous enrichment with the corresponding multimers in A2<sup>+</sup> donors.



FIGURE 3. Frequencies of naive CD8 T cells directed against A2restricted Ag in seronegative A2<sup>+</sup> and A2<sup>-</sup> donors. A, Frequencies of whole A2 multimer<sup>+</sup> CD8 T cells in seronegative A2<sup>+</sup> donors. Analysis was performed after multimer-based enrichment from 108 PBMCs, and results were expressed as number of multimer<sup>+</sup> cells within Dump<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> cells. Symbols represent individual A2<sup>+</sup> donors; horizontal bars indicate mean value (n = 10). B, Overall distribution of Agspecific CD8 T cells within naive and memory compartments. Black symbols represent individual A2<sup>+</sup> donors seronegative for HCV, HCMV, and HIV. The frequency of naive MP58-specific T cells could not be assessed in A2<sup>+</sup> donors because all multimer<sup>+</sup> cells showed a memory phenotype in all donors tested, consistent with their previous exposure to influenza virus. Shaded symbols correspond to A2<sup>+</sup> donors seropositive for HCV, HCMV, or influenza virus. Horizontal bars indicate median values for seronegative donors (n = 10). The p values, calculated using a nonparametric two-tailed Mann-Whitney U test, are indicated for seronegative donors (n = 10). C, Frequencies of naive (CD45RO<sup>-</sup>,CD27<sup>bright</sup>, CD11a<sup>low</sup>) (see Fig. 1) Agspecific CD8 T cells in A2<sup>+</sup> donors. Results are expressed as number of naive multimer<sup>+</sup> CD8 T cells within Dump<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> naive cells. Horizontal bars indicate mean value. The p values were calculated using two-tailed unpaired t tests (n = 10).

this observation to several other self- and non–self-epitopes. Overall, high-avidity T cells specific for MelA<sub>27</sub>, PGT<sub>178</sub>, and NS3<sub>1073</sub> were 5- to 10-fold more frequent within naive T cells from A2<sup>+</sup> than A2<sup>-</sup> individuals (Fig. 5*D*). Therefore, although the scarcity of pp65<sub>495</sub>- and Gag<sub>77</sub>-specific T cells precluded detailed assessment of their avidity, these results indicated that the naive T cell repertoire of A2<sup>+</sup> donors is skewed toward high-avidity recognition of several self-, tumor, and viral Ags restricted by A2.

## Characterization of CD4 peripheral T cells specific for A2/peptide complexes

Besides CD8 T cells, a low but detectable fraction of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T cells was stained by A2 multimers in all donors (Fig. 6A). Such



**FIGURE 4.** Impact of A2 expression on naive Ag-specific CD8 T cell frequencies. Comparison of naive Ag-specific CD8 T cell frequencies in HCV-, HCMV-, and HIV-seronegative donors expressing (black symbols) or not (open symbols) A2. Horizontal bars indicate mean value. The p values were calculated using two-tailed unpaired t tests (n = 10). ns, not significant.

MHC class I-restricted CD4 T cells were previously reported (39, 40), but their frequency, origin, molecular, and functional relationships with their CD8 counterparts could not be studied into detail thus far. Like their CD8 counterparts, CD4 T cells stained by MelA<sub>27</sub>/A2 multimers predominantly expressed AV2.2<sup>+</sup> TCRs (Fig. 6*B*). The functional relevance of these A2 multimer<sup>+</sup> CD4 subsets was supported by their specific binding to A2 multimers loaded with relevant peptides only (Fig. 6*C*). Moreover, A2 multimer<sup>+</sup> CD4 T cell lines and clones were stimulated by their cognate but not irrelevant peptide Ag (Fig. 6*D*). Interestingly, they produced much more IL-2 than their CD8 counterparts after Ag stimulation, consistent with a T helper-like phenotype (Supplemental Fig. 3 and data not shown).

#### Unlike their CD8 counterparts, the frequency of A2-restricted CD4 T cells is not affected by MHC class I expression

The frequency of A2 multimer<sup>+</sup> naive CD4 T cells ranged from  $5 \times 10^{-6}$  to  $5 \times 10^{-5}$ , depending on the A2/peptide complex studied. Although such frequencies were much lower within CD4 than CD8 T cells for most A2-restricted Ag studied, they were in the same range for pp65495/A2-specific T cells, irrespective of their coreceptor phenotype and A2 haplotype (Fig. 7A, 7B). Unexpectedly, the frequency of A2 multimer<sup>+</sup> CD4 T cells correlated with the frequency of CD8 T cells specific for the corresponding pMHC complexes in  $A2^+$  and  $A2^-$  donors (Fig. 7C). Although CD4/CD8 double-positive T cells were strictly gated out, the above correlation could reflect coreceptor modulation on a subset of naive CD8 T cells occurring through yet undefined mechanisms after their intrathymic selection. To address this, we assessed the impact of MHC class I expression on the frequency of A2restricted CD4 T cells. Unlike CD8 T cells, the frequencies of A2 multimer<sup>+</sup> CD4 T cells were similar in A2<sup>+</sup> and A2<sup>-</sup> individuals, irrespective of the Ag studied (Supplemental Fig. 4). We also compared the frequency of A2 multimer<sup>+</sup> CD4 and CD8 T cells in patients with decreased expression of surface MHC class I molecules, because of congenital deficiency for one subunit of the TAP peptide transporter (41). In line with previous studies, TAP deficiency led to a strongly decreased frequency of A2 multimer<sup>+</sup> CD8 T cells (42). However, it did not affect the frequency of A2 multimer<sup>+</sup> CD4 T cells, resulting in a 100-fold higher CD4/CD8 ratio within T cells stained by MelA<sub>27</sub>/A2 multimers between TAP-deficient versus TAP-sufficient donors (Fig. 8A). This indicated that A2 multimer<sup>+</sup> CD4 T cells were not selected by MHC class I molecules.
FIGURE 5. TCR repertoire and functional features of naive Ag-specific CD8 T cells from A2<sup>+</sup> and A2<sup>-</sup> donors. A, MelA27- and MP58-specific CD8 T cell populations from A2<sup>+</sup> (left dot plots) and A2<sup>-</sup> donors (right dot plots) showed similarly biased usage of TCR AV2 and BV17 regions. Analysis was performed on Dump CD3+CD4-CD8+-gated events after multimer-based enrichment from 108 PBMCs. Percentage of A2 multimer<sup>+</sup> T cells stained or not by anti-AV2 and anti-BV17 mAbs are indicated. Results are representative of five different experiments, each with a different donor. B, Functional analysis of NS31073- and MelA27-specific CD8 T cell lines isolated from A2<sup>-</sup> donors. In vitroexpanded Ag-specific T cell lines (see Materials and *Methods*) were incubated with A2<sup>+</sup> TAP-deficient (T2) target cells loaded with relevant or irrelevant peptides and tested for intracellular cytokine production and degranulation. Percentage of IFN- $\gamma^+$ , TNF- $\alpha^+$ , or CD107<sup>+</sup> cells are indicated. Data are representative of three independent T cell lines isolated from different donors. C, Percentage of MelA<sub>27</sub>, PGT<sub>178</sub>, and NS31073 CD8-null multimer<sup>+</sup> T cells among corresponding Ag-specific naive T cell populations in A2<sup>+</sup> or A2<sup>-</sup> donors. Frequencies of CD8-null multimer<sup>+</sup> cells were estimated after CD8-null multimer-based enrichment of 10<sup>8</sup> cells. Horizontal bars indicate median values. Data were compared using a two-tailed Mann-Whitney U test. D, Frequencies of high-avidity naive Ag-specific CD8 T cells in A2<sup>+</sup> and A2<sup>-</sup> donors. Horizontal bars indicate mean value. The p values were calculated using two-tailed unpaired t tests.

## Similar frequencies of A2-restricted CD4 and CD8 T cells in $A2^-$ individuals

The higher frequency of A2-restricted CD8 than CD4 T cells in A2<sup>-</sup> individuals could be explained by either an MHC class I recognition bias of the CD8 T cell repertoire because of selection by non-A2 MHC class I alleles, or alternatively, it could merely reflect enhanced avidity of CD8 T cells for MHC class I complexes, conferred by expression of the proper coreceptor. To address this, we compared the frequencies of specific CD4 and CD8 T cells using A2 multimers unable to engage CD8 coreceptors. Although much higher in CD8 than CD4 T cells in A2<sup>+</sup> donors (Fig. 8*B*, *upper panel*), the frequencies of MelA<sub>27</sub>, PGT<sub>178</sub>-, and

NS3<sub>1073</sub>-specific T cells stained by CD8-null multimers were barely higher in CD8 than in CD4 subsets from A2<sup>-</sup> individuals (Fig. 8*B*, *lower panel*). Thus, the presence of A2-restricted CD8 T cells in A2<sup>-</sup> donors seems primarily explained by crossreactivity for the corresponding Ags of T cells selected by unrelated or weakly related pMHC complexes.

#### Discussion

Except for MelA<sub>27</sub>-specific T cells, whose frequency, phenotype, and repertoire features in naive individuals were previously described (38, 43), little was known thus far about the size and features of naive Ag-specific T cells in humans. In this regard,





PGT<sub>178</sub> NS31073 pp65<sub>495</sub> MeIA<sub>27</sub> Gag77 А 1091 55 10 ß С MeIA<sub>27</sub>: irrelevant MeIA27: MeIA27 В CD8-CD4+ D 90 0.1 MelA<sub>27</sub> 0.1 124 - AV2 MelA<sub>27</sub>-APC TNFa

FIGURE 7. Frequencies of A2 multimer<sup>+</sup> CD4 T cell populations in  $A2^+$  and  $A2^-$  donors. A, Comparison of naive Ag-specific CD4 versus CD8 T cell frequencies in donors expressing (left panel) or not (right panel) A2. Symbols represent individual donors; horizontal bars indicate mean value. Values of p were calculated using two-tailed unpaired t tests (n = 10). B, Frequencies of naive Ag-specific CD4 T cells vary from one Ag to another. Each symbol represents individual donors expressing or not A2. Note that frequencies of naive CD4<sup>+</sup> T cells specific for a given Ag were not affected by A2 expression (see also Supplemental Fig. 4). Horizontal bars indicate mean value. The p values were calculated using two-tailed unpaired t tests (n = 20). C, Correlations between the frequencies of naive CD4 and naive CD8 T cells specific for the same pMHC complex. Each symbol corresponds to the frequency of naive CD8 T cells specific for a given A2/peptide complex plotted against the frequency of naive CD4 T cells specific for the same A2/peptide complex in a given individual. The p values and  $r^2$  values were calculated using a Pearson's test (n = 50).



the current study provides a first estimate of the frequency range of naive CD8 T cells against several immunodominant Ag in adults. The frequencies of subsets reacting against distinct A2restricted Ag in  $A2^+$  individuals showed up to 2 log differences. Such a heterogeneity is in line with recent analyses of the murine naive repertoire within which the size of specific T cell subsets greatly varied depending on the Ag specificity studied (17, 19, 20). Also in agreement with murine studies, frequencies of human CD8 T cells specific for a given Ag showed limited interindividual variations. Such a restrained behavior was less expected in humans, owing to their heterogeneous immunological history and MHC background.

The proportions of naive CD8 T cells within cell subsets specific for a given pMHC complex greatly varied from one Ag specificity to another in seronegative A2<sup>+</sup> individuals. Moreover, such proportions correlated with the frequency of naive CD8 T cells directed against the corresponding Ag (n = 50;  $r^2 = 0.535$ ; p <0.001). The presence of Ag-specific memory cells in unprimed individuals could reflect either stimulation by cross-reactive Ag or, as suggested by recent studies in mice, a phenotypic switch of Ag-unexperienced cells after homeostatic expansion (44). This might lead to heterogeneous exhaustion or reduction of the naive compartment, depending on the Ag specificity studied, and therefore could explain the heterogeneous frequencies of naive-specific T cell subsets observed in our study. However, T cells directed for instance against Gag<sub>77</sub> versus MelA<sub>27</sub> showed on average a 100fold frequency difference but only a 2-fold difference in terms of percentage of naive T cells. Therefore, other mechanisms likely account for such frequency differences. Homeostatic expansion of naive cells is probably not involved in this study because one of the most frequent naive CD8 subset, specific for MelA<sub>27</sub>, was previously shown to carry high numbers of TCR recombination excision DNA circles (45), indicating limited proliferation after thymic selection and exit.

Analysis of CD4 T cells specific for various A2/peptide complexes provided possible insights into the mechanisms contributing to the heterogeneity of Ag-specific naive CD8 T cell frequencies. We obtained strong evidence that A2-restricted CD4 cells were not selected by HLA class I molecules and thus that A2 multimer binding to CD4 T cells reflected cross-reactivity for A2-restricted Ag of TCRs selected by MHC class II molecules. The frequencies of A2 multimer<sup>+</sup> CD4 T cells were in the same range than those of CD8 T cells stained by A2 multimers unable to engage CD8 coreceptors in A2<sup>-</sup> donors. This supports the assumption that A2 multimer binding in both cases reflects inherent cross-reactivity for A2/peptide complexes of the naive T cell repertoire, irrespective of its selection context. The peripheral repertoire is thought to be made of  $25-100 \times 10^6$  distinct clonotypes totaling  $\sim 10^{12}$  T cells (1). With an estimated frequency of A2-restricted CD4 T cells of  $5 \times 10^{-6}$  to  $5 \times 10^{-5}$ , 20-200 distinct TCRs should cross-react to a given A2/peptidecomplex in a coreceptor-independent fashion and ~10-fold more with the help of the CD8 coreceptor. Such estimates are clearly in the range of previously predicted values (46) and are consistent with the view that TCRs show a high level of crossreactivity. Importantly, the correlation between the frequencies of CD4 and CD8 T cells specific for a given A2/peptide complex would indicate that the size of naive A2-restricted CD8 T cells is determined at least in part by the cross-reactivity level of the TCR repertoire.



**FIGURE 8.** Analysis of selection modalities of A2 multimer<sup>+</sup> CD4 or CD8 T cells from A2<sup>-</sup> donors. *A*, Contour plots of A2 multimer<sup>+</sup> CD4 T cells in TAP-sufficient versus -deficient donors after multimer-based enrichment from  $10^8$  PBMCs. Percentages of CD4<sup>-</sup> versus CD4<sup>+</sup> Dump<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>multimers<sup>+</sup> T cells are indicated. Data are representative of two different TAP-deficient donors. *B*, Comparative analysis of the frequencies of A2 CD8-null multimer-specific T cells within naive CD4 and CD8 compartments. Horizontal bars indicate mean value. The *p* values were calculated using two-tailed unpaired *t* tests.

Besides inherent TCR cross-reactivity, comparative analysis of A2<sup>+</sup> versus A2<sup>-</sup> donors unveiled a predominantly positive, although heterogeneous impact of the HLA-A2 background on the frequencies of A2-restricted naive T cells, depending on the Ag specificity studied. In line with the correlation between the percentage and frequencies of naive A2-restricted T cells in A2<sup>+</sup> -seronegative donors, the percentage of naive T cells also correlated with the ratio of naive T cell frequencies between A2<sup>+</sup> and A2<sup>-</sup> donors, irrespective of their specificity for either natural or artificial A2-restricted peptides (Fig. 9). In other words, the higher the proportion of naive T cells within cell subsets specific for a defined A2/peptide complex in A2<sup>+</sup>-seronegative individuals, the higher the positive impact of A2 expression on naive T cell frequencies. On the basis of previously proposed models, the above correlation could reflect variable contribution of positive versus negative intrathymic selection to peripheral repertoire remodeling, depending on the avidity of thymocyte interactions with selecting endogenous pMHC complexes and their structural relationships with pMHC encountered in the periphery. Accordingly, the low frequency of pp65495-specific T cells could be explained by their intrathymic selection by poorly related pMHC complexes, hence the lower impact of the A2 background on their frequency and a higher probability to be cross-activated by weakly related pMHC complexes in seronegative individuals. By contrast, nondegenerate highaffinity interactions with low-density A2/peptide complexes closely related or identical to MelA27/A2 or PGT178/A2 could



**FIGURE 9.** Correlation between the impact of A2 expression on the naive T cell frequency and the mean percentage of naive Ag-specific CD8 T cells in A2<sup>+</sup> donors. The impact of A2 expression was calculated by dividing the mean frequency of naive CD8 T cells in A2<sup>+</sup> donors (n = 10 for each specificity) by the mean frequency of naive CD8 T cells in A2<sup>+</sup> donors (n = 10 for each specificity). Black symbols indicate data obtained with artificial peptides multimers (p800 and p21). Although p800 and p21 multimers are homologous respectively to MelA<sub>27</sub> and NS3<sub>1073</sub> ones, T cell-specific repertoires showed no overlap (Fig. 4 and data not shown). The p values and  $r^2$  values were calculated using a Pearson's test (n = 7).

explain the much higher frequency of MelA<sub>27</sub>- or PGT<sub>178</sub>specific T cells in A2<sup>+</sup> than in A2<sup>-</sup> individuals and their low cross-reactivity, reflected by their predominantly naive phenotype in seronegative healthy donors. Irrespective of this issue, these results, which suggest that the dominant contribution of either positive or negative selection on the shaping of the A2-restricted repertoire will depend on the pMHC complex studied, could reconcile seemingly opposite conclusions drawn from analysis of T cell repertoires selected by a single pMHC complex (8, 11). Further analyses of Ag-specific subsets at different intrathymic developmental stages will probably allow more direct validation of these hypotheses in humans.

Although initial frequencies of naive T cell precursors seem to regulate the strength and immunodominance of memory responses in the mouse (17, 19, 20), our study indicates that immunodominance of A2-restricted T cell response in humans is not always associated with a high frequency of naive T cell precursors. In particular, pp65495-specific T cells can make up a large fraction of virus-specific CD8 T cells in A2<sup>+</sup> individuals along acute HCMV infection (32, 33) but were found at similarly low frequencies within both naive CD8 and CD4 T cells, irrespective of their A2 phenotype. Moreover, both pp65495specific CD8 and CD4 T cells were expanded and switched to a memory phenotype in some HCMV-seropositive donors (F. Legoux, X. Saulquin, and M. Bonneville, unpublished observations), suggesting peripheral activation of both subsets in the context of a natural infection. In this particular case, intrathymic selection of T cell precursors by a given MHC allele seems dispensable for the generation of a functional high-avidity and peptide-specific peripheral response restricted by the same or a related MHC allele or even from a distinct MHC class. Therefore, in light of the distinct functional -specialization of MHC class I- and class II-restricted T cells, the driving force of intrathymic positive selection might not be to focus T cells toward recognition of self-MHC but rather to link selection of developing T cells by a given class of MHC molecules to a particular functional program. In this regard, owing to the distinct functional profiles of A2-restricted CD8 and CD4 T cells suggested by our results, the possibility that MHC I-restricted CD4 T cells provide help for CD8 T cell responses specific for the same Ag would certainly deserve further investigations.

#### Acknowledgments

We thank Drs. O. Lantz (Curie Institute, Paris, France), B. Malissen (Centre Immunologie Marseille Luminy, Marseilles, France), and M. Albert (Pasteur Institute, Paris, France) for critical reading of the manuscript and Dr. D. Speiser (Ludwig Institute for Cancer Research, Lausanne, Switzerland) for providing the TCR AV2-specific mAb.

#### Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

#### References

- Arstila, T. P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286: 958–961.
- Goldrath, A. W., and M. J. Bevan. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402: 255–262.
- Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. Annu. Rev. Immunol. 21: 139–176.
- 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.
- Bevan, M. J. 1977. In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* 269: 417–418.
- 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: 247–260.
- Scott, B., H. Blüthmann, H. S. Teh, and H. von Boehmer. 1989. The generation of mature T cells requires interaction of the αβ T-cell receptor with major histocompatibility antigens. *Nature* 338: 591–593.
- Berg, L. J., and M. M. Davis. 1989. T-cell development in T cell receptor αβ transgenic mice. Semin. Immunol. 1: 105–116.
- Ashton-Rickardt, P. G., A. Bandeira, J. R. Delaney, L. Van Kaer, H. P. Pircher, R. M. Zinkernagel, and S. Tonegawa. 1994. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76: 651–663.
- 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: 221–231.
- Wang, B., T. M. Primeau, N. Myers, H. W. Rohrs, M. L. Gross, L. Lybarger, T. H. Hansen, and J. M. Connolly. 2009. A single peptide-MHC complex positively selects a diverse and specific CD8 T cell repertoire. *Science* 326: 871– 874.
- Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 84: 521–529.
- 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: 179–186.
- Tourne, S., T. Miyazaki, A. Oxenius, L. Klein, T. Fehr, B. Kyewski, C. Benoist, and D. Mathis. 1997. Selection of a broad repertoire of CD4<sup>+</sup> T cells in H-2Ma0/0 mice. *Immunity* 7: 187–195.
- Takeda, S., H. R. Rodewald, H. Arakawa, H. Bluethmann, and T. Shimizu. 1996. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4<sup>+</sup> T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5: 217–228.
- Tanchot, C., F. A. Lemonnier, B. Pérarnau, A. A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science* 276: 2057–2062.
- Kotturi, M. F., I. Scott, T. Wolfe, B. Peters, J. Sidney, H. Cheroutre, M. G. von Herrath, M. J. Buchmeier, H. Grey, and A. Sette. 2008. Naive precursor frequencies and MHC binding rather than the degree of epitope diversity shape CD8<sup>+</sup> T cell immunodominance. *J. Immunol.* 181: 2124–2133.
- Moon, J. J., H. H. Chu, J. Hataye, A. J. Pagán, M. Pepper, J. B. McLachlan, T. Zell, and M. K. Jenkins. 2009. Tracking epitope-specific T cells. *Nat. Protoc.* 4: 565–581.
- Moon, J. J., H. H. Chu, M. Pepper, S. J. McSorley, S. C. Jameson, R. M. Kedl, and M. K. Jenkins. 2007. Naive CD4<sup>+</sup> T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27: 203–213.
- Obar, J. J., K. M. Khanna, and L. Lefrançois. 2008. Endogenous naive CD8<sup>+</sup> T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity* 28: 859–869.
- Geiger, R., T. Duhen, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2009. Human naive and memory CD4<sup>+</sup> T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. J. Exp. Med. 206: 1525–1534.
- Chu, H. H., J. J. Moon, K. Takada, M. Pepper, J. A. Molitor, T. W. Schacker, K. A. Hogquist, S. C. Jameson, and M. K. Jenkins. 2009. Positive selection optimizes the number and function of MHCII-restricted CD4<sup>+</sup> T cell clones in the naive polyclonal repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 11241–11245.
- the naive polyclonal repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 11241–11245.
  23. Bodinier, M., M. A. Peyrat, C. Tournay, F. Davodeau, F. Romagne, M. Bonneville, and F. Lang. 2000. Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. [Published erratum appears in 2001 *Nat. Med.* 7: 129.] *Nat. Med.* 6: 707–710.

- Neveu, B., K. Echasserieau, T. Hill, K. Kuus-Reichel, E. Houssaint, M. Bonneville, and X. Saulquin. 2006. Impact of CD8-MHC class I interaction in detection and sorting efficiencies of antigen-specific T cells using MHC class I/peptide multimers: contribution of pMHC valency. *Int. Immunol.* 18: 1139–1145.
- Choi, E. M., J. L. Chen, L. Wooldridge, M. Salio, A. Lissina, N. Lissin, I. F. Hermans, J. D. Silk, F. Mirza, M. J. Palmowski, et al. 2003. High avidity antigen-specific CTL identified by CD8-independent tetramer staining. *J. Immunol.* 171: 5116–5123.
- Pittet, M. J., V. Rubio-Godoy, G. Bioley, P. Guillaume, P. Batard, D. Speiser, I. Luescher, J. C. Cerottini, P. Romero, and A. Zippelius. 2003. α3 Domain mutants of peptide/MHC class I multimers allow the selective isolation of high avidity tumor-reactive CD8 T cells. J. Immunol. 171: 1844–1849.
- Guillaume, P., D. F. Legler, N. Boucheron, M. A. Doucey, J. C. Cerottini, and I. F. Luescher. 2003. Soluble major histocompatibility complex-peptide octamers with impaired CD8 binding selectively induce Fas-dependent apoptosis. J. Biol. Chem. 278: 4500–4509.
- Davodeau, F., M. A. Peyrat, M. M. Hallet, J. Gaschet, I. Houde, R. Vivien, H. Vie, and M. Bonneville. 1993. Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human γδ T cells and expression of V9JPC1 γ/V2DJC δ-encoded T cell receptors. J. Immunol. 151: 1214–1223.
- Neveu, B., E. Debeaupuis, K. Echasserieau, B. le Moullac-Vaidye, M. Gassin, L. Jegou, J. Decalf, M. Albert, N. Ferry, J. Gournay, et al. 2008. Selection of high-avidity CD8 T cells correlates with control of hepatitis C virus infection. *Hepatology* 48: 713–722.
- Kawakami, Y., S. Eliyahu, K. Sakaguchi, P. F. Robbins, L. Rivoltini, J. R. Yannelli, E. Appella, and S. A. Rosenberg. 1994. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2–restricted tumor infiltrating lymphocytes. J. Exp. Med. 180: 347–352.
- 31. Dutoit, V., V. Rubio-Godoy, M. J. Pittet, A. Zippelius, P. Y. Dietrich, F. A. Legal, P. Guillaume, P. Romero, J. C. Cerottini, R. A. Houghten, et al. 2002. Degeneracy of antigen recognition as the molecular basis for the high frequency of naive A2/Melan-a peptide multimer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in humans. J. Exp. Med. 196: 207–216.
- Trautmann, L., M. Rimbert, K. Echasserieau, X. Saulquin, B. Neveu, J. Dechanet, V. Cerundolo, and M. Bonneville. 2005. Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. *J. Immunol.* 175: 6123–6132.
- Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274: 94–96.
- 34. Lehner, P. J., E. C. Wang, P. A. Moss, S. Williams, K. Platt, S. M. Friedman, J. I. Bell, and L. K. Borysiewicz. 1995. Human HLA-A0201–restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the Vβ17 gene segment. J. Exp. Med. 181: 79–91.
- Trautmann, L., N. Labarrière, F. Jotereau, V. Karanikas, N. Gervois, T. Connerotte, P. Coulie, and M. Bonneville. 2002. Dominant TCR Vα usage by virus and tumor-reactive T cells with wide affinity ranges for their specific antigens. *Eur. J. Immunol.* 32: 3181–3190.
- De Rosa, S. C., L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, and M. Roederer. 2001. 11-Color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat. Med.* 7: 245–248.
- Münz, C., R. Obst, W. Osen, S. Stevanović, and H. G. Rammensee. 1999. Alloreactivity as a source of high avidity peptide-specific human CTL. J. Immunol. 162: 25–34.
- 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, et al. 2006. Ex vivo characterization of allo-MHC-restricted T cells specific for a single MHCpeptide complex. J. Immunol. 176: 2330–2336.
- Boyle, L. H., J. C. Goodall, and J. S. Gaston. 2004. Major histocompatibility complex class I-restricted alloreactive CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunology* 112: 54–63.
- Nishimura, M. I., D. Avichezer, M. C. Custer, C. S. Lee, C. Chen, M. R. Parkhurst, R. A. Diamond, P. F. Robbins, D. J. Schwartzentruber, and S. A. Rosenberg. 1999. MHC class I-restricted recognition of a melanoma antigen by a human CD4<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocyte. *Cancer Res.* 59: 6230–6238.
- 41. de la Salle, H., J. Zimmer, D. Fricker, C. Angenieux, J. P. Cazenave, M. Okubo, H. Maeda, A. Plebani, M. M. Tongio, A. Dormoy, and D. Hanau. 1999. HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1. *J. Clin. Invest.* 103: R9–R13.
- Cerundolo, V., and H. de la Salle. 2006. Description of HLA class I- and CD8deficient patients: insights into the function of cytotoxic T lymphocytes and NK cells in host defense. *Semin. Immunol.* 18: 330–336.
- 43. Pittet, M. J., D. Valmori, P. R. Dunbar, D. E. Speiser, D. Liénard, F. Lejeune, K. Fleischhauer, V. Cerundolo, J. C. Cerottini, and P. Romero. 1999. High frequencies of naive Melan-A/MART-1–specific CD8<sup>+</sup> T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. J. Exp. Med. 190: 705–715.
- 44. Haluszczak, C., A. D. Akue, S. E. Hamilton, L. D. Johnson, L. Pujanauski, L. Teodorovic, S. C. Jameson, and R. M. Kedl. 2009. The antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. J. Exp. Med. 206: 435–448.
- Zippelius, A., M. J. Pittet, P. Batard, N. Rufer, M. de Smedt, P. Guillaume, K. Ellefsen, D. Valmori, D. Liénard, J. Plum, et al. 2002. Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans. *J. Exp. Med.* 195: 485–494.
- Mason, D. 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today* 19: 395–404.

# III. ANTIGÉNICITÉ DES COMPLEXES PCMH DANS LE RÉPERTOIRE T NON SÉLECTIONNÉ

#### A. OBJECTIFS POURSUIVIS

L'étude présentée précédemment et publiée dans le *Journal of Immunology* a révélé des différences de fréquences de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs selon leur spécificité antigénique. Ces différences de fréquences peuvent être dues (i) à des événements de sélections thymiques, (ii) à des différences d'antigénicité des complexes pCMH étudiés, et/ou (iii) à une expansion homéostatique différentielle en périphérie.

Aussi il nous a semblé intéressant d'étudier les fréquences de cellules pA2-spécifiques dans le thymus, pour (i) accéder aux fréquences de cellules Ag-spécifiques au sein d'un répertoire T n'ayant pas encore subi les étapes de sélections thymiques, et (ii) évaluer l'impact de l'expansion homéostatique périphérique sur les fréquences de précurseurs T naïfs en périphérie. D'autre part, pour rechercher des paramètres structuraux potentiellement associés aux différences d'antigénicité des complexes pCMH, un travail collaboratif a été mis en place avec l'équipe de D. Housset à Grenoble, visant à résoudre la structure tridimensionnelle de chacun des complexes pCMH inclus dans l'étude (voir Résultats V).

#### **B.** Méthodologie

Des fragments thymiques prélevés pour des raisons chirurgicales au cours d'interventions cardiaques sur de jeunes enfants, séronégatifs pour le VHC, le HCMV et le VIH et non porteurs de mélanome (neufs enfants A2<sup>+</sup>, neuf enfants A2<sup>-</sup>) ont été collectés. Les mêmes complexes pCMH que ceux décrits dans le tableau 2 ont été inclus dans l'étude. 200 millions de thymocytes ont été incubés avec chaque multimère fluorescent de complexes pCMH, et un enrichissement immunomagnétique des cellules multimère<sup>+</sup> a été réalisé comme décrit précédemment. À l'issue de l'enrichissement, les thymocytes ont été analysés pour leur viabilité (7-AAD), pour l'expression de surface du CD3, CD4, CD8, CD1a et pour le marquage par le multimère fluorescent. La fréquence des thymocytes spécifiques de chaque complexe pCMH a été déterminée au sein de chacun des trois compartiments thymiques : doubles positifs CD8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (DP), simples positifs CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> (SP8) et simples positifs CD8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (SP4) (Fig. 34).



Figure 34: Stratégie de fenêtrage pour la détection de thymocytes multimère<sup>+</sup>.

Après une première gate sélectionnant les thymocytes sur la base de leurs taille et granulométrie, les cellules mortes sont exclues de l'analyse tandis que les CD3<sup>+</sup> sont analysées pour leur phénotype CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ou DP, puis pour le marquage par le multimère de complexes pCMH.

C. Détection de thymocytes pA2-spécifiques dans les différents compartiments thymiques

Des thymocytes spécifiques de chacun des complexes pCMH étudiés ont pu être détectés au sein des trois compartiments thymiques, chez les donneurs  $A2^+$  (Fig. 35) comme chez les donneurs  $A2^-$  (Fig. 36).



Figure 35: Détection de thymocytes multimère+ au sein de chacun des trois compartiments thymiques d'un donneur A2<sup>+</sup>.

Les dot plots présentent les profils multimère de complexes pCMH *versus* CD3 des événements gatés comme indiqué dans la figure 34 et obtenus après enrichissement immunomagnétique de  $2.10^8$  thymocytes d'un donneur A2<sup>+</sup>, représentatif de 9 donneurs différents. Les nombres d'événements multimère<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> sont indiqués.



Figure 36: Détection de thymocytes multimère<sup>+</sup> au sein de chacun des trois compartiments thymiques d'un donneur A2<sup>-</sup>.

Les dot plots présentent les profils multimère de complexes pCMH *versus* CD3 des événements gatés comme indiqué dans la figure 34 et obtenus après enrichissement immunomagnétique de  $2.10^8$  thymocytes d'un donneur A2<sup>+</sup>, représentatif de 9 donneurs différents. Les nombres d'événements multimère<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> sont indiqués.

#### 1. Les biais moléculaires des répertoires T Ag-spécifiques dans le thymus

La spécificité du marquage par les multimères de complexes pCMH fluorescents est supportée par l'analyse des marqueurs moléculaires des répertoires MelA/A2 et MP/A2-spécifiques. En périphérie, en effet, ces populations CD8<sup>+</sup> ont été décrites comme utilisant préférentiellement les segments de TCR AV2 et BV17, respectivement (Dietrich et al., 2003; Lehner et al., 1995; Moss et al., 1991; Trautmann et al., 2002).

Les thymocytes de chacun des trois compartiments thymiques (DP, SP4 et SP8)  $MelA/A2^+$  et MP/A2<sup>+</sup> présentent un usage préférentiel des régions de TCR AV2 et BV17, respectivement (Fig. 37). Les cellules DP représentant un répertoire de TCR « non sélectionné », les biais de répertoire observés en périphérie ne sont pas générés par des processus de sélection thymique. De plus, puisque les thymocytes SP représentent un répertoire de TCR mature, mais non périphérique, on peut affirmer que les biais des répertoires MP/A2- et MelA/A2-spécifiques observés en périphérie ne sont pas imposés par des mécanismes d'expansion périphérique préférentielle de certains clonotypes, mais reflètent plutôt certaines contraintes structurales imposées par le complexe pCMH. Ces données sont en accord avec les observations cristallographiques des complexes ternaires TCR-MelA/A2 (Cole et al., 2009) et TCR-MP/A2 (Stewart-Jones et al., 2003), qui documentent l'importance des domaines germinaux CDR1 $\alpha$  et des CDR1 $\beta$  et 2 $\beta$  pour la reconnaissance de MelA/A2 et MP/A2, respectivement.





**Figure 37: Biais moléculaires des répertoires thymiques MelA/A2 et MP/A2-spécifiques.** Les événements ont été gatés sur les compartiments DP, SP8 et SP4, après enrichissement des cellules multimère<sup>+</sup> de 2.10<sup>8</sup> thymocytes. Les pourcentages de cellules multimère<sup>+</sup> AV2<sup>+</sup> ou multimère<sup>+</sup> BV17<sup>+</sup>

sont indiqués. Les résultats sont représentatifs de trois donneurs différents.

D'autre part, le répertoire PGT/A2-spécifique est également biaisé vers l'usage du segment génique AV2, dans le thymus comme en périphérie (Fig. 38). Le peptide PGT (LLAGIGTVPI) présente une très forte homologie de séquence terminale avec MelA (ELAGIGILTV), et on sait que le CDR1 $\alpha$  du segment AV2, dans les structures TCR-MelA/A2 et TCR-Tax/A2, contacte précisément cette partie peptidique N-terminale. Ainsi, il est tentant de spéculer que le mode de docking du TCR AV2<sup>+</sup>, sur les complexes PGT/A2 comme MelA/A2 ou Tax/A2, est identique et dicté par les boucles germinales V du TCR.



Figure 38: Usage préférentiel du segment génique AV2 par les populations thymiques (panel du haut) et périphériques (panel du bas) dirigées contre PGT/A2.

Les pourcentages de cellules multimère<sup>+</sup> AV2<sup>+</sup> sont indiqués. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois donneurs différents.

### 2. Les populations T CD8<sup>+</sup> Ag-spécifiques ne sont pas remodelées en périphérie

Aucune différence significative n'a été observée entre les fréquences de thymocytes SP8 et celles des lymphocytes T périphériques CD8<sup>+</sup> naïfs dirigés contre un complexe antigénique donné (Fig. 39). Ainsi, le répertoire T CD8<sup>+</sup> périphérique ne semble pas subir de remodelage majeur dans le sang périphérique, et les grandes variations de tailles des populations T naïves Ag-spécifiques ne sont pas explicables par des mécanismes d'expansion homéostatique périphérique.



**Figure 39: Les populations T CD8**<sup>+</sup> **Ag-spécifiques ne sont pas remodelées en périphérie.** Fréquences des cellules multimère<sup>+</sup> chez des individus A2<sup>+</sup> (panel de gauche) ou A2<sup>-</sup> (panel de droite) au sein du compartiment naïf CD8<sup>+</sup> périphérique (symboles noirs) ou du compartiment SP8 thymique (symboles rouges et verts). Les fréquences sont exprimées en nombre de thymocytes multimère<sup>+</sup> au sein des thymocytes 7-AAD<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Les barres horizontales représentent les valeurs moyennes.

### 3. Les populations CD4<sup>+</sup> pA2-spécifiques subissent une contraction en périphérie

Chez tous les donneurs, des thymocytes spécifiques de chacun des complexes pCMH étudiés ont pu être détectés au sein du compartiment SP4 (Fig. 35 et 36). Contrairement aux données obtenues sur les populations SP8, les cellules Ag-spécifiques du compartiment CD4<sup>+</sup> sont plus fréquentes dans le thymus que dans le sang périphérique, pour l'ensemble des spécificités antigéniques étudiées à l'exception du complexe pp65/A2 (Fig. 40). Cette observation peut refléter (i) un remodelage périphérique du compartiment CD4<sup>+</sup> reconnaissant des complexes pCMH de classe I, ou (ii) un biais expérimental lié à la délimitation de la population SP4 au moment de l'analyse des données cytométriques. En effet, selon le modèle

cinétique de choix de lignage CD4/CD8, les thymocytes DP ayant reçu un signal de sélection positive via leur TCR arrêtent la transcription du gène *Cd8* (et ce quelque soit la spécificité de leur TCR), devenant ainsi des thymocytes intermédiaires et bipotents  $Cd4^+Cd8^-$  apparaissant  $CD4^+CD8^{low}$  (Singer et Bosselut, 2004). S'ils sont destinés au compartiment T  $CD8^+$ , le gène *Cd8* sera réexprimé tandis que l'expression du *Cd4* sera réprimée. Ainsi, il est possible que nous ayons considéré comme « SP4 » des thymocytes finalement destinés à devenir « SP8 ».

La molécule de CMH I-like CD1a est un marqueur des thymocytes corticaux (Brigl et Brenner, 2004), et est donc susceptible de nous éclairer sur le stade de maturation des thymocytes multimère<sup>+</sup> analysés. Quelle que soit leur spécificité antigénique, les thymocytes DP sont CD1a<sup>+</sup> (Fig. 40B et C), en accord avec leur localisation corticale. Le compartiment SP4 contient plus de cellules CD1a<sup>+</sup> que le compartiment SP8, suggérant que les cellules SP4, dans notre analyse, sont globalement moins matures que les SP8 (en accord avec le fait que les thymocytes immatures downrégulent d'abord le CD8). Pour tester l'hypothèse selon laquelle cette différence pourrait biaiser notre analyse comparative des populations Agspécifiques CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> entre le thymus et la périphérie, les fréquences de thymocytes multimère<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> (c'est-à-dire médullaires, et donc présumés matures) ont été calculées au sein des thymocytes CD1a. Dans le compartiment SP8, ces fréquences sont identiques à celles de l'ensemble des thymocytes multimère<sup>+</sup> (non montré). Dans le compartiment SP4, les fréquences de thymocytes Ag-spécifiques matures (à l'exception de celles dirigées contre MelA/A2 et pp65/A2) restent supérieures à celles des lymphocytes T CD4 du sang périphérique (Fig. 40A, symboles bleus), suggérant que contrairement au compartiment CD8<sup>+</sup>, le compartiment CD4<sup>+</sup> pCMH I-restreint subit une contraction en périphérie.



Figure 40: Les populations CD4<sup>+</sup> pA2-spécifiques subissent une contraction en périphérie.

A. Analyse comparative des fréquences de cellules multimère+ au sein des lymphocytes T périphériques CD4+ (symboles noirs, 10 donneurs), des thymocytes SP4 (symboles blancs, 9 donneurs) et des thymocytes SP4 CD1a- (symboles bleus, 9 donneurs), chez les individus A2+. Les barres horizontales représentent les valeurs moyennes. Les p-valeurs ont été calculées par un test de student non apparié à deux entrées (n=9). \*\*\* p<0,0001. \*\* p<0,001. \*\* p<0,01. ns: non significatif. B. Expression du marqueur cortical CD1a par les populations MelA/A2-spécifiques des compartiments SP8, SP4 et DP. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois donneurs différents. C. Pourcentages de thymocytes CD1a+ au sein des thymocytes multimère+ SP8 (symboles noirs), SP4 (symboles blancs) et DP (symboles rouges) chez 9 donneurs A2+.

#### 4. Les thymocytes DP constituent un répertoire de TCR non sélectionné

Des thymocytes spécifiques de chacun des complexes pCMH étudiés ont pu être détectés au sein du compartiment DP chez les individus A2<sup>+</sup> et A2<sup>-</sup> (Fig. 35 et 36). Contrairement aux données obtenues sur les fréquences de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> périphériques, l'expression du HLA-A2 n'a pas d'impact sur la fréquence des thymocytes DP pA2-spécifiques (Fig. 41A), suggérant que le répertoire DP n'a pas encore subit les étapes de sélections thymiques. Les cellules DP représentent donc un répertoire de TCR « vierge » qui, contrairement aux répertoires T périphériques, n'a pas encore été biaisé vers la reconnaissance des molécules du CMH du soi. Il constitue ainsi un modèle idéal pour l'étude de l'antigénicité « naturelle » des complexes pCMH, c'est-à-dire de la réactivité inhérente du répertoire de TCR vis-à-vis du CMH.



Figure 41: Les thymocytes DP constituent un répertoire de TCR non sélectionné.

A. Fréquences des thymocytes DP dirigés contre des épitopes A2-restreints chez des donneurs exprimant (en rouge) ou non (en vert) le HLA-A2. B. Corrélations entre les fréquences moyennes de cellules DP et SP8 (chez donneurs  $A2^+$ : en rouge ; chez donneurs  $A2^-$ : en vert), SP4 (en blanc) ou B (en bleu) spécifiques du même complexe antigénique.

#### 4.1. Variations de réactivité selon le pCMH considéré

Les fréquences de thymocytes DP multimère<sup>+</sup> varient selon le complexe pCMH considéré (Fig. 41A). De façon intéressante, la hiérarchie des fréquences dans le répertoire T non sélectionné est conservée dans le répertoire T mature CD8<sup>+</sup> des donneurs A2<sup>+</sup> (n=6, r<sup>2</sup>=0.97, p=0.001), mais aussi A2<sup>-</sup> (n=6, r<sup>2</sup>=0.97, p=0.001), ainsi que dans le répertoire T CD4<sup>+</sup> (n=6, r<sup>2</sup>=0.94, p=0.005) (Fig. 41B). Avant même les étapes de sélection thymique, la taille du répertoire T Ag-spécifique est donc dépendante du complexe pCMH considéré. Ce résultat, qui est en accord avec les données obtenues en périphérie et notamment avec l'observation d'une corrélation entre les fréquences de cellules T Ag-spécifiques dans les compartiments CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> naïfs, suggère que certains complexes antigéniques sont plus facilement reconnus que d'autres par les TCR fraîchement réarrangés.

En particulier, il est tentant d'associer la forte réactivité du répertoire T vis-à-vis de MelA/A2 ou PGT/A2 à l'usage préférentiel par ces populations T du segment génique AV2, dont on sait que le CDR1 est impliqué dans l'interaction avec le A2 et avec le peptide MelA (Cole et al., 2009). L'antigénicité (que nous définissons comme la taille de la population multimère<sup>+</sup>) d'un complexe pCMH serait donc liée à la capacité du peptide dans le sillon à ne pas interférer, ou même à favoriser les interactions entre les motifs germinaux du TCR et les hélices  $\alpha$  du CMH. Ainsi certains peptides (i.e. MelA ou PGT) permettraient la mise en place de ces interactions tandis que d'autres (i.e. pp65 ou Gag), du fait de résidus peptidiques contraignants, imposeraient au TCR pour leur reconnaissance une contribution prépondérante des domaines CDR3, qui sont diversifiés et donc peu fréquents dans le répertoire.

# 4.2. Analyse comparative de la réactivité d'un répertoire irrelevant : le répertoire B

Nos données ont indiqué que le répertoire T est systématiquement plus réactif vis-à-vis de certains Ag (i.e. MelA/A2) que d'autres (i.e. Gag/A2). Ces variations d'antigénicité peuvent refléter l'altération ou la promotion des interactions conservées entre le TCR et le CMH. Alternativement, on peut imaginer que le complexe MelA/A2 présente simplement moins de contraintes structurales que Gag/A2 pour engager un ligand (indépendamment de la nature de ce ligand), ou encore que la qualité des complexes pCMH recombinants soit elle-même hétérogène (problème de stabilité peptidique par exemple). Pour tester ces possibilités, nous avons investigué la réactivité vis-à-vis des complexes pCMH I du répertoire B, c'est-à-dire

d'un répertoire très diversifié, généré de façon similaire au répertoire T par réarrangement somatique de segments de gènes, mais non biaisé vers la reconnaissance du CMH. Des cellules tétramère<sup>+</sup> ont été détectées au sein des lymphocytes vivants CD3<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>, c'est-à-dire des lymphocytes B, après enrichissement immunomagnétique à partir d'un échantillon de 10<sup>8</sup> PBMC (Fig. 42). De plus, un enrichissement simultané des PBMC après marquage par deux tétramères distincts a montré que la majorité de ces cellules B fixait le CMH de façon peptide-spécifique *ex vivo*. Les cellules B naïves sont définies comme dépourvues d'expression de surface de CD27 (Agematsu et al., 2000; Nolte et al., 2009). Nos données préliminaires suggèrent que les fréquences de lymphocytes B naïfs (i.e. CD27<sup>-</sup>) pA2-spécifiques ne sont pas affectées par l'expression du A2 (données non montrées). En revanche, elles varient selon le complexe pA2 considéré, allant de 2,5.10<sup>-5</sup> (pour les cellules B naïves NS3/A2-spécifiques) à 2,5.10<sup>-4</sup> (pour les cellules B naïves MP/A2-spécifiques) (Fig. 43).



Figure 42: Détection de lymphocytes B pCMH-spécifiques.

Une fraction des cellules 7AAD<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> est marquée de façon peptide-spécifique par des tétramères de complexes pCMHI, après un double enrichissement immunomagnétique des cellules tétramère+ au sein de 10<sup>8</sup> PBMC.



Figure 43: Fréquences de lymphocytes B naïfs spécifiques des complexes pCMH I.

L'analyse a été réalisée après un double enrichissement immunomagnétique et les résultats sont exprimés en nombres de cellules multimère+ au sein des cellules 7-AAD<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>. Seules les cellules marquées de façon peptide-dépendante ont été comptabilisées.

De façon intéressante, les fréquences de lymphocytes B pA2-spécifiques ne sont pas corrélées aux fréquences de lymphocytes T dirigées contre le même Ag, dans les répertoires naïfs (p=0.30; r=0.50; n=6) (Fig. 41B, symboles bleus). Cette observation, qui doit être confirmée par l'étude de plus nombreux donneurs, renforce l'idée que les variations d'antigénicité des complexes pCMH dans les répertoires T avant et après sélections ne sont pas imputables à l'Ag seul, ni à la qualité des complexes pCMH recombinants, mais sont inscrites dans l'interaction TCR-pCMH, et sont liées au mode de reconnaissance CMH restreint des lymphocytes T.

## D. Remodelages quantitatifs du répertoire T par les sélections thymiques

Le remodelage par les sélections thymiques des populations T spécifiques d'un complexe pCMH donné peut être évalué en comparant les fréquences de thymocytes multimère<sup>+</sup> au sein des compartiments DP (c'est-à-dire avant les étapes de sélections positive et négative) et SP8 ou SP4 (après les sélections positive et négative). La figure 44 illustre les réactivités des différents compartiments thymiques vis-à-vis des Ag étudiés.



Figure 44: Fréquences des thymocytes multimère<sup>+</sup> dans les compartiments DP (en rouge ou en vert), SP8 (en noir) et SP4 (en blanc), chez des individus A2<sup>+</sup> (panel du haut) ou A2<sup>-</sup> (panel du bas).

#### 1. Réactivité inhérente du répertoire pré-sélectionné vis-à-vis du CMH

Les fréquences de thymocytes DP multimère<sup>+</sup> sont élevées (5.10<sup>-5</sup> à 5.10<sup>-7</sup> selon la spécificité antigénique considérée) (Fig. 44, symboles rouges ou verts). La réactivité du répertoire T non sélectionné vis-à-vis des complexes pCMH de classe I (indépendamment du peptide) est ainsi identique à celle du répertoire T CD4<sup>+</sup>, qui représente un répertoire biaisé vers la reconnaissance du CMH de classe II (Fig. 44, symboles blancs). De plus, l'analyse comparative des fréquences de cellules Ag-spécifiques dans les compartiments DP et SP8 indique que les sélections thymiques sur le A2 ou sur d'autres allèles de classe I n'ont pas d'effet sur la réactivité du répertoire T CD8 vis-à-vis de certains Ag (comme pp65/A2 ou

Gag/A2) (Fig. 44, symboles noirs). Ces données suggèrent que le répertoire non sélectionné est déjà remarquablement réactif vis-à-vis des complexes pA2, en accord avec l'idée que les segments V, et notamment les CDR1 et 2, ont coévolués avec les hélices  $\alpha$  des CMH (Jerne, 1971).

#### 2. Impact des sélections thymiques sur la réactivité du répertoire T

Les motifs d'expression des corécepteurs CD4 et CD8 à la surface des thymocytes permettent d'estimer leur stade de maturation. La figure 45 présente les profils d'expression des corécepteurs des populations spécifiques de MelA/A2, NS3/A2 et Gag/A2, et illustre l'impact quantitatif différentiel des sélections thymiques sur les différentes populations T Agspécifiques.



Figure 45: Répartition des populations thymiques spécifiques de MelA/A2, NS3/A2 et Gag/A2 au sein des compartiments DP, SP8 ou SP4.

Après enrichissement immunomagnétique à partir de  $2.10^8$  thymocytes A2<sup>+</sup> (ligne du haut) ou A2<sup>-</sup> (ligne du bas), les cellules 7-AAD<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> multimère<sup>+</sup> ont été analysées pour l'expression des corécepteurs CD4 et CD8. Les résultats sont représentatifs de 5 expériences indépendantes, chacune avec un donneur différent.

Chez les donneurs A2<sup>+</sup>, alors que les populations MelA/A2<sup>+</sup> sont très préférentiellement SP8, les thymocytes Gag/A2-spécifiques semblent répartis de manière aléatoire au sein des compartiments DP, SP8 ou SP4. L'expression de l'allèle de restriction a un impact visible sur la taille et la localisation des populations dirigées contre MelA/A2 (et NS3/A2 dans une moindre mesure), mais ne semble pas affecter le répertoire Gag/A2-spécifique.

Pour faciliter la lecture des données et s'affranchir des éventuelles variations interindividuelles des fréquences de thymocytes Ag-spécifiques, l'impact quantitatif des sélections thymiques peut être exprimé en taux d'enrichissement (Fig. 46). Pour chaque donneur, le taux d'enrichissement en thymocytes SP8 Ag-spécifiques est calculé en divisant la fréquence dans le compartiment SP8 par la fréquence dans le compartiment DP.



Figure 46: Taux d'enrichissement en cellules Ag-spécifiques entre le compartiment DP et le compartiment SP8 chez neuf donneurs  $A2^+$  (en rouge) et neuf donneurs  $A2^-$  (en vert).

2.1. Remodelage basal du répertoire T CD8 vers la restriction au CMH de classe I

Les taux d'enrichissement chez les donneurs  $A2^-$  (en vert) nous renseignent sur le remodelage basal du répertoire T CD8 imposé par des allèles HLA non A2. Selon l'Ag considéré, les sélections thymiques sur des allèles non A2 ont un impact variable sur la réactivité du répertoire de TCR vis-à-vis du A2. Ainsi, les sélections thymiques A2-indépendantes augmentent fortement la réactivité du répertoire T vis-à-vis de MelA/A2, PGT/A2, NS3 et MP, mais n'ont qu'un faible impact sur l'enrichissement en thymocytes réactifs vis-à-vis de pp65/A2 ou Gag/A2. De façon intéressante, on trouve chez les donneurs A2<sup>-</sup> une corrélation positive entre le taux d'enrichissement en cellules SP8 multimère<sup>+</sup> et les fréquences de thymocytes DP spécifiques du même complexe antigénique pA2 (n=6, r<sup>2</sup>=0.91, p=0.012). Ainsi, mieux un complexe pCMH sera reconnu par le répertoire de TCR non sélectionné, plus efficace sera l'enrichissement en cellules spécifiques au cours de la maturation thymique, et ce même chez des donneurs A2-. Cette observation est en accord avec l'idée que les complexes pCMH les plus antigéniques (i.e. interagissant avec de larges

populations T naïves) sont capables de contacter des motifs conservés des TCR. Les sélections thymiques, en favorisant la survie des cellules T restreintes au CMH du soi, enrichiraient le répertoire T en TCR capables d'exploiter ces motifs d'interaction conservés, et ce même lorsque les sélections sont médiées par des allèles de CMH non apparentés à l'allèle de restriction. Ce modèle est illustré par la composition en segment de TCR AV2 des différents répertoires T (Fig. 47). Le compartiment T non sélectionné ne contient qu'1 à 2% de cellules AV2<sup>+</sup>, toutes spécificités antigéniques confondues. À l'issue des sélections thymiques, le segment AV2 est exprimé en moyenne par 5.2% des cellules T CD8<sup>+</sup> et 3.6% des cellules T CD4<sup>+</sup> périphériques. Cet enrichissement, qui est indépendant de l'expression du A2 (données non montrées), reflète probablement la capacité de ce segment génique particulier à interagir avec les CMH, et légèrement préférentiellement avec les molécules du CMH de classe I.

Au-delà des polymorphismes allèles-spécifiques des hélices  $\alpha$  des CMH, les modalités de la restriction au CMH présentent donc vraisemblablement des caractéristiques partagées, en accord avec l'hypothèse d'une co-évolution entre les CMH et les éléments germinaux du TCR (Jerne, 1971).



Figure 47: Pourcentages de cellules T exprimant le segment de TCR AV2, indépendamment de leur spécificité antigénique et de leur haplotype HLA, dans les compartiments DP, CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>.

2.2. Remodelage A2-dépendant du répertoire T

L'analyse comparative des taux d'enrichissement en cellules SP8 multimère<sup>+</sup> chez les donneurs  $A2^+ vs A2^-$  nous renseigne sur l'impact de l'expression de l'allèle de restriction sur la réactivité du répertoire post-sélectionné vis-à-vis de peptides A2-restreints. Comme chez les donneurs  $A2^-$ , le taux d'enrichissement des cellules SP8 multimère<sup>+</sup> est corrélé positivement à la réactivité inhérente du répertoire non sélectionné vis-à-vis du même complexe pA2 (n=6, r<sup>2</sup>=0.896, p=0.015), indiquant que les sélections thymiques ont accentué les caractéristiques de restriction au A2 qui étaient déjà présentes avant sélections. Chez les donneurs  $A2^+$  cependant, l'enrichissement en cellules SP8 pA2-spécifiques est

systématiquement plus élevé que chez les donneurs A2<sup>-</sup>, indiquant que au delà du remodelage basal du répertoire vers une restriction globale au CMH, des mécanismes allèle-spécifiques interviennent pour focaliser le répertoire vers la reconnaissance du CMH du soi, c'est-à-dire pour assortir le répertoire de TCR nouvellement réarrangé aux caractéristiques génériques imposées aux peptides par le sillon du A2, et aux résidus polymorphes A2-spécifiques.

Cependant, selon l'Ag considéré, l'expression du A2 a un impact très variable sur la réactivité du répertoire de TCR. Ainsi, alors que l'expression du A2 augmente 8 fois la réactivité du répertoire vis-à-vis de MelA/A2 ou PGT/A2, les taux d'enrichissement en cellules pp65/A2 ou Gag/A2-spécifiques ne sont pratiquement pas affectés par l'expression de l'allèle de restriction (Fig. 46, les barres verticales indiquent l'enrichissement A2-dépendant). Cette observation suggère que ces deux complexes pCMH, contrairement à MelA/A2 ou PGT/A2, ne présentent pas de topologie particulièrement conservée, proche d'une topologie « standard » qui permettrait d'être facilement contacté par des motifs d'interaction germinaux du TCR. En accord avec cette hypothèse, les cellules pp65/A2 et Gag/A2-spécifiques sont trouvées indifféremment dans les compartiments CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> (Fig. 44), et les populations spécifiques recrutés au cours des réponses primaires sont polyclonales (Day et al., 2001; Trautmann et al., 2005). D'autre part, le fort impact de l'expression du A2 sur l'enrichissement en cellules MelA/A2 et PGT/A2 peut refléter une sélection positive de ces populations sur des complexes pCMH identiques ou structuralement apparentés.

#### E. Remodelage qualitatif du répertoire T par les sélections thymiques

Pour compléter cette analyse de l'impact quantitatif de l'expression du A2 sur les populations T pA2-spécifiques, nous avons voulu investiguer, d'un point de vue qualitatif, le rôle des sélections thymiques sur le remodelage du répertoire T.

Pour analyser *in vitro* les cellules T pA2-spécifiques isolées des PBMC de donneurs A2<sup>+</sup> et A2<sup>-</sup>, la technique d'enrichissement immunomagnétique précédemment décrite a été couplée à une étape de tri à l'aide d'un trieur (BD FACS Aria) (Fig 25). Les cellules T CD8<sup>+</sup> multimère<sup>+</sup> ont été isolées et amplifiées *in vitro*, de façon non spécifique, en présence de cellules nourricières irradiées (PBMC et lignées B-EBV), d'un activateur polyclonal (la phytohémagglutinine A), et d'IL-2. Ce « feeder » apporte les facteurs de croissance nécessaires à l'expansion des lymphocytes T, sans induire de biais de cultures (David-Ameline et al., 1996). Après trois semaines de culture *in vitro*, les cellules T CR. Chacune des populations T CD8<sup>+</sup> est pure à plus de 95% et fixe le multimère pCMHI de manière peptide-

spécifique (Fig. 48A). Comme nous l'avons déjà documenté *ex vivo* (Legoux et al., 2010), les lignées pA2-spécifiques générées *in vitro* à partir de donneurs exprimant ou non le A2 présentent les mêmes biais moléculaires, suggérant un docking similaire du TCR sur le pCMH.



Figure 48: Impact qualitatif de l'expression de l'allèle de restriction.

A. Histogrammes représentatifs des profils de marquage des populations T CD8+ par des multimères de complexes pCMH relevants (en blanc) ou irrelevants (en gris). En termes de peptide-spécificité ou d'intensité de fluorescence, aucune différence n'est détectable entre les populations isolées de donneurs A2<sup>+</sup> et A2<sup>-</sup>. B. Production d'IFNγ (en haut) et dégranulation (en bas) des populations T CD8<sup>+</sup> MelA/A2-, PGT/A2- et NS3/A2-spécifiques isolées de donneurs A2<sup>+</sup> (en noir) ou A2<sup>-</sup> (en blanc) et cultivées pendant 5h avec les cellules cibles suivantes: cellules T2 chargées en peptide relevant (MelA, PGT ou NS3, 100 nM) ; cellules T2 chargées en peptide contrôle (100 nM) ; cellules T2 non chargées ; lignée B-EBV (i.e. transformée par le virus d'Epstein Barr) A2<sup>+</sup> ; lignée B-EBV A2<sup>-</sup>. Comme décrit par d'autres groupes (Gervois et al., 1996), le seuil d'activation requit pour la dégranulation semble plus bas que celui requit pour produire de l'IFNγ.

Nous avons testé la peptide-dépendance des cellules T CD8<sup>+</sup> dirigées contre MelA/A2, PGT/A2 et NS3/A2 en mesurant leur réactivité vis-à-vis de cellules cibles chargées en peptide relevant ou irrelevant, et exprimant ou non le HLA-A2. Nos données indiquent que sur les huit lignées A2<sup>-</sup> étudiées, cing dégranulent de façon A2-dépendante mais peptide-indépendante, tandis que les populations isolées de donneurs A2<sup>+</sup> sont toutes strictement peptide-spécifiques (Fig. 48B). Ces observations suggèrent que l'expression du A2, au-delà de l'impact quantitatif documenté à l'aide des multimères de pCMH, a un impact majeur sur la qualité des répertoires pA2-spécifiques.

Certaines lignées T A2<sup>-</sup> présentant une peptide-dépendance pour la fixation du multimère, mais une peptide-indépendance pour l'activation fonctionnelle, on peut proposer que les cellules réactives de façon peptide-indépendante expriment un TCR capable d'engager avec une faible affinité certains motifs polymorphes des hélices  $\alpha$  du A2, tout en s'accommodant de la présence d'un peptide dans le sillon du CMH. La densité de l'antigène reconnu à la surface de la CPA est dès lors très importante et donne lieu à une interaction de très forte avidité, susceptible de compenser la faible affinité du TCR pour le CMH allogénique (Bevan, 1984). En revanche, il est probable que les multimères de complexes pCMH présentent une valence trop faible pour être engagés sans l'aide de contacts avec le peptide.

Compte tenu des biais de répertoires similaires que nous avons documentés *ex vivo* au sein des populations  $A2^+$  et  $A2^-$  (Legoux et al., 2010), les différences fonctionnelles que nous documentons ici *in vitro* sont probablement médiées par de fines différences de positionnement des CDR3 au dessus du sillon peptidique. On peut proposer que certains CDR3 perturbent l'établissement d'interactions stables entre certains segments germinaux du TCR et les hélices  $\alpha$  du A2, rendant impossible la formation d'un complexe qui ne contacterait pas le peptide. Ce sont les thymocytes exprimant de tels TCR qui survivraient aux étapes de sélections médiées par le HLA-A2.

#### F. CONCLUSIONS

Cette étude rapporte pour la première fois la réactivité du répertoire T humain pré sélectionné vis-à-vis de différents antigènes immunodominants viraux et tumoraux restreints par le HLA-A2. De façon intéressante, cette réactivité est élevée, et comparable pour certains Ag à celle du répertoire T CD8<sup>+</sup> périphérique, qui représente un répertoire utile ayant passé les étapes de sélections thymiques. Cette observation suggère que la restriction au CMH est une propriété intrinsèque des segments géniques V du TCR, en accord avec les données obtenues dans les années 90 sur des modèles murins (Merkenschlager et al., 1997; Zerrahn et al., 1997). Compte tenu de la grande variabilité des allèles du CMH et de l'absence de point de contact conservé identifiable par l'analyse cristallographique des complexes TCR-pCMH (Housset et Malissen, 2003), cette restriction globale et inhérente du TCR au CMH est probablement médiée par un guidage moléculaire lâche dicté par les boucles germinales du TCR. On ne peut exclure toutefois que la réactivité inhérente du répertoire T pré-sélectionné soit imposée (du moins en partie) par les mécanismes de réarrangements des segments V(D)J, dont on sait qu'ils peuvent favoriser l'usage de certaines séquences de TCR (Candéias et al., 1991; Venturi et al., 2008).

Cependant, même si les sélections thymiques n'affectent pas quantitativement la réactivité du répertoire T vis-à-vis de certains Ag (comme pp65/A2 ou Gag/A2), nos données *in vitro* indiquent que le répertoire T des donneurs  $A2^{-}$ , mais pas  $A2^{+}$ , peut contenir des TCR capables d'accommoder le A2 quelque soit le peptide qu'il présente, suggérant que les sélections thymiques biaisent qualitativement le répertoire T vers un mode de reconnaissance peptide-spécifique des complexes pCMH. Les contributions respectives des sélections positive et négative dans l'établissement de ce biais sont difficiles à évaluer. En effet, on peut imaginer, comme le suggère le travail de l'équipe de P. Marrack (Huseby et al., 2005), que le rôle clef est joué par la sélection négative qui éliminerait du répertoire les thymocytes exprimant des TCR capables d'établir une interaction stable avec le CMH sans contacter le peptide (éventuellement parce que les CDR3 de ces TCR ne perturberaient pas les interactions TCR-CMH conservées). Alternativement, et compte tenu du très fort enrichissement en cellules MelA/A2- et PGT/A2-spécifiques au cours des sélections thymiques, on peut concevoir que les cellules cross-réactives ne soient pas délétées, mais « noyées » dans les populations sélectionnées positivement et strictement peptide-spécifiques. Cette dernière hypothèse, qui prédit la présence d'une composante peptide-indépendante chez les donneurs A2<sup>+</sup>, doit être investiguée plus finement par une analyse au niveau clonal de la crossréactivité des populations  $A2^+$ .

Enfin, nous établissons de manière formelle que les importantes différences de fréquences des lymphocytes T Ag-spécifiques en périphérie ne sont pas dues uniquement aux sélections thymiques, mais existent déjà dans le répertoire T fraîchement réarrangé. Les chaînes latérales du peptide, ainsi que sa conformation dans la poche du A2, peuvent donc moduler positivement ou négativement les interactions TCR-CMH intrinsèques. Tandis que des peptides comme MelA ou PGT permettraient l'établissement d'interactions conservées entre le TCR et le HLA-A2 (et notamment l'interaction du AV2 avec l'hélice  $\alpha$  du A2), il est probable que la topologie d'Ag comme pp65 ou Gag empêche toute reconnaissance inhérente. Les étapes de sélections positive et négative, même sur des allèles non apparentés à l'allèle de restriction, ont pour effet global d'accentuer la réactivité inhérente du répertoire T vis-à-vis du CMH. Les peptides exploitant cette réactivité inhérente pour leur interaction avec le TCR sont ainsi dramatiquement mieux reconnus par le répertoire post-sélectionné (cf. l'enrichissement d'un facteur 13 des cellules MelA/A2- ou PGT/A2-spécifiques chez les donneurs A2<sup>+</sup>). À l'inverse, les Ag ne permettant pas de conserver le bénéfice de cette empreinte d'interaction entre les TCR et les CMH ne sont pas mieux reconnus par les thymocytes SP8 que par les thymocytes DP ou SP4.

## IV. RÔLE DE L'EXPRESSION DU BON CORÉCEPTEUR DANS L'ACTIVATION FONCTIONNELLE DES LYMPHOCYTES T

#### A. OBJECTIFS POURSUIVIS

En plus des lymphocytes T  $CD8^+$ , une faible fraction de cellules T  $CD4^+CD8^-$  est marquée par les multimères de complexes pA2 chez tous les donneurs. De telles cellules CD4<sup>+</sup> restreintes par le CMH de classe I ont déjà été reportées sporadiquement (Boyle et al., 2004; Nishimura et al., 1999; Kobayashi et al., 2001; Darrow et al., 1996; Somasundaram et al., 2000), mais leurs fréquences, leur origine et leurs caractéristiques moléculaires et fonctionnelles n'ont pas pu être étudié en détail jusqu'à présent. Dans notre étude publiée dans The Journal of Immunology (Legoux et al., 2010), nous avons montré que ces cellules fixent le A2 de manière peptide-spécifique et qu'elles présentent les mêmes marqueurs moléculaires que leurs homologues CD8<sup>+</sup>, c'est-à-dire un usage préférentiel des segments de TCR AV2 et BV17 pour les populations spécifiques de MelA/A2 et MP/A2 respectivement. De plus, nous montrions que les fréquences des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs exprimant des TCR spécifiques d'épitopes A2-restreints sont indépendantes de l'expression du A2, et ne sont pas affectées par l'expression du CMH de classe I, contrairement à leurs pendants CD8<sup>+</sup>, indiquant une sélection thymique sur des molécules du CMH de classe II. Pour compléter ce travail de caractérisation ex vivo des populations T CD4<sup>+</sup> CMH I-spécifiques, nous avons voulu analyser *in vitro* et comparer à leurs homologues CD8<sup>+</sup> leurs propriétés fonctionnelles, leur avidité pour l'Ag et leur éventuelle pertinence dans un contexte plus physiologique.

### B. OBTENTION DE POPULATIONS T POLYCLONALES CD4<sup>+</sup> PCMH I-SPÉCIFIQUES

Les fréquences des cellules T naïves CD4<sup>+</sup> pCMH I-spécifiques varient *ex vivo* de 10<sup>-5</sup> à 10<sup>-7</sup> selon l'Ag considéré (Fig. 49), soit une cellule multimère<sup>+</sup> au sein de 0,3 à 30 millions de PBMC (en considérant que 30% des PBMC sont des cellules CD4<sup>+</sup> naïves). L'analyse *in vitro* des cellules CD4 pCMHI-spécifiques a donc nécessité de coupler la technique d'enrichissement immunomagnétique précédemment décrite à une étape de purification en cytométrie en flux (BD FACS Aria) (Fig. 25). Les cellules multimère<sup>+</sup> des deux compartiments CD4 et CD8 ont été « sorties » et amplifiées *in vitro*, de façon non spécifique, en présence de cellules nourricières irradiées (PBMC et lignées B-EBV), d'un activateur polyclonal (la phytohémagglutinine A), et d'IL-2. Comme précédemment indiqué, ce

« feeder » apporte les facteurs de croissance nécessaires à l'expansion des lymphocytes T, sans induire de biais de cultures (David-Ameline et al., 1996).



Figure 49: Fréquences des cellules T CD4<sup>+</sup> naïves pA2-spécifiques au sein de PBMC de donneurs sains, indépendamment de l'expression du HLA-A2 (Legoux et al., 2010).

Nous avons focalisé notre étude aux cellules T CD4<sup>+</sup> les plus fréquentes, c'est-à-dire à celles dirigées contre MelA/A2, PGT/A2 et NS3/A2, chez trois donneurs A2<sup>+</sup> (P1 à P3) et trois donneurs A2<sup>-</sup> (N1 à N3). Le tableau 3 donne la liste des populations T obtenues. Après trois semaines de culture *in vitro*, les populations T revenues au repos ont été analysées pour leur pureté et pour la spécificité de leur TCR. Chacune des populations T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> est pure à plus de 95% et fixe le multimère pCMHI de manière peptide-spécifique (Fig. 50A). De plus, l'analyse des segments de TCR V $\beta$  utilisés par les cellules T Ag-spécifiques montre que les populations obtenues sont polyclonales (Fig. 50B) et conservent le biais AV2 décrit dans la littérature pour les populations dirigées contre MelA/A2 (non montré).

Donneurs A2+	T CD8	T CD4	Donneurs A2-	T CD8	T CD4
	MelA/A2			MelA/A2	MelA/A2
P1	PGT/A2		N1	PGT/A2	PGT/A2
				NS3/A2	NS3/A2
	PGT/A2	NS3/A2		MelA/A2	MelA/A2
P2	NS3/A2		N2	PGT/A2	PGT/A2
				NS3/A2	
	MelA/A2	MelA/A2		MelA/A2	
Р3	PGT/A2	PGT/A2	N3	PGT/A2	
	NS3/A2	NS3/A2			

 Tableau 3 : Populations T Ag-spécifiques obtenues par enrichissement immunomagnétique couplé à un tri par cytométrie en flux.



Figure 50: Caractérisation des populations T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> pCMH I-spécifiques.

A. Pureté et spécificité des populations T pA2-spécifiques obtenues par enrichissement immunomagnétique et FACS. Les histogrammes montrent les marquages par des multimères pA2 irrelevants (en gris) ou relevant (en blanc) des populations T CD8<sup>+</sup> (panel du haut) et CD4<sup>+</sup> (panel du bas) issues d'un donneur A2<sup>-</sup> (donneur N1). Les pourcentages de cellules spécifiques du multimère relevant sont indiqués. Les données sont représentatives des autres populations T obtenues. B. Polyclonalité des populations T Ag-spécifiques. Une population T MelA/A2-spécifique a été marquée par un panel d'Ac anti-V $\beta$  et analysée par cytométrie en flux. Les données sont représentatives des autres populations T obtenues.

## C. Analyse fonctionnelle comparative des populations T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> Dirigées contre le même Ag

# 1. Les cellules CD4<sup>+</sup> répondent moins fortement à l'Ag que leurs homologues CD8<sup>+</sup>

L'avidité fonctionnelle des différentes populations T marquées par les multimères de complexes pCMHI a été mesurée par marquage intracytoplasmique de cytokines après coculture avec des cellules cibles chargées en peptide (Fig. 51A). En accord avec d'autres études (Neveu et al., 2008), les concentrations peptidiques nécessaires pour atteindre 50% de la production maximale d'IFN $\gamma$  (EC<sub>50</sub>) sont très variables selon les donneurs et les Ag testés. Cependant, la gamme d'EC<sub>50</sub> couverte par les populations T CD8<sup>+</sup> est similaire à celle des populations CD4<sup>+</sup> (Fig. 51B). En revanche, la magnitude des réponses T CD8<sup>+</sup> est beaucoup plus importante que celle de leurs homologues CD4<sup>+</sup>, 5 des 9 lignées CD4<sup>+</sup> ne produisant pas ou très peu d'IFN $\gamma$  après stimulation à forte concentration peptidique (10 µM) (Fig 51A et D, panel de gauche).

Ces différences fonctionnelles peuvent être dues à l'expression différentielle de récepteurs inhibiteurs, ou à un défaut intrinsèque des fonctions effectrices ou de la signalisation du TCR des cellules CD4<sup>+</sup>. Pour tester ces possibilités, les populations T MeIA/A2- et NS3/A2-spécifiques ont été analysées pour leur capacité à produire de l'IFNγ après stimulation par des cellules P815-A2 chargées avec des concentrations variables d'Ac anti-CD3 (OKT3, 10 µg/mL) (Fig. 51C). Dans ces conditions de stimulation, toutes les lignées T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> produisent une réponse de magnitude similaire (Fig. 51D, panel de droite). D'autre part, aucune des lignées T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> analysées n'exprime les récepteurs inhibiteurs PD1 (Barber et al., 2006), ILT2 (Dietrich et al., 2001) ou CD94 (Lazetic et al., 1996) (données non montrées). Les populations T CD4<sup>+</sup> n'étant pas intrinsèquement défaillantes, les différences fonctionnelles observées peuvent refléter (i) une différence d'avidité des cellules T pour les CPA, ou (ii) un rôle clef du corécepteur CD8 dans la cascade d'activation du lymphocyte.



Figure 51: Différences de sensibilité à l'Ag des populations  $CD4^+$  (en vert) et  $CD8^+$  issues de donneurs  $A2^+$  (en rouge) ou  $A2^-$  (en orange) pCMH I-spécifiques.

A. Avidités fonctionnelles des populations T Ag-spécifiques  $CD4^+$  et  $CD8^+$ . Après incubation pendant 5h avec des cellules T2 chargées en peptide à des concentrations variables, les cellules T ont été analysées pour la production intracellulaire d'IFNγ. B. Avidité fonctionnelle des cellules T CD8 A2<sup>+</sup>, CD8 A2<sup>-</sup> et CD4 spécifiques de MelA/A2, PGT/A2 et NS3/A2, exprimée par la concentration peptidique (M) nécessaire pour atteindre 50% de la production maximale d'IFNγ (EC<sub>50</sub>). C. Les populations T MelA/A2 et NS3/A2 spécifiques ont été analysées pour leur capacité à produire de l'IFNγ après stimulation par des cellules P815-A2 chargées avec des concentrations variables d'Ac anti-CD3 (OKT3). D. Pourcentages de cellules T IFNγ<sup>+</sup> après stimulation par des cellules cibles chargées en peptide relevant (10 µM) (panel de gauche) ou en Ac anti-CD3 (10 µM) (panel de droite).

### 2. Les cellules T CD4<sup>+</sup> présentent une forte avidité pour les complexes pCMHI

L'avidité d'une cellule T pour la CPA est déterminée par de nombreux facteurs, parmi lesquels la densité de l'antigène à la surface de la CPA, l'affinité du TCR pour le complexe pCMH, et l'engagement des corécepteurs. Pour évaluer la contribution de ces paramètres dans les différences fonctionnelles observées entre les sous populations  $CD4^+$  et  $CD8^+$ , nous avons utilisé des oligomères de complexes pCMHI (i) de valences variées, et (ii) présentant une affinité normale (oligomères WT), réduite (oligomères A2m) ou abrogée (oligomères CD8null) pour le corécepteur CD8 (voir Résultats **I.** *C*.).

L'avidité du TCR peut être évaluée de façon globale en mesurant le taux de dissociation de tétramères de complexes pCMH WT (c'est-à-dire des oligomères de complexes pCMH de faible valence et présentant une affinité normale pour le CD8) en présence d'un multimère WT de même spécificité (c'est-à-dire des oligomères de complexes pCMH WT de forte valence) (Trautmann et al., 2005). L'analyse des dissociations par compétition des tétramères WT MeIA/A2 et NS3/A2, qui reflète le K<sub>off</sub> de l'interaction, montre que les cellules CD4<sup>+</sup>, bien qu'incapables d'engager leur ligand avec l'aide du corécepteur CD8, présentent globalement un plus faible K<sub>off</sub> et donc probablement une plus forte avidité que leurs homologues CD8<sup>+</sup> (Fig. 52). Les mesures de dissociation ne corrèlent pas cependant avec les données fonctionnelles (EC<sub>50</sub>). Nous avons donc cherché à investiguer la contribution du corécepteur dans l'interaction des cellules T avec les multimères de complexes pCMH et avec les CPA.



Figure 52: Courbes de dissociation des tétramères WT MelA/A2 et NS3/A2 en présence de multimères WT de même spécificité.

Les cellules ont été incubées durant 1h avec les tétramères pA2-APC WT à 10  $\mu$ g/mL et 4°C, avant d'être lavées trois fois et incubées durant le temps indiqué avec les multimères pA2-PE WT à 2  $\mu$ g/mL.

# 3. Contribution du corécepteur CD8 dans l'interaction TCR-pCMH et dans l'activation fonctionnelle du lymphocyte

#### 3.1. Contribution du corécepteur CD8 dans l'interaction avec le pCMH

Pour évaluer l'affinité des TCR exprimés par les cellules  $CD4^+$  et  $CD8^+$  en s'affranchissant de l'aide apportée par le corécepteur CD8, des multimères de complexes pCMH CD8null de valence fixe ont été utilisés. Comme attendu, les populations  $CD4^+$  fixent de la même façon les multimères A2m et CD8null (Fig. 53A et B). En revanche certaines populations  $CD8^+$  ne sont plus marquées par le multimère CD8null, confirmant qu'elles expriment des TCR de plus faible affinité pour l'Ag (Fig. 53A et B).

3.2. Contribution du corécepteur CD8 dans l'activation fonctionnelle du lymphocyte T

Pour comparer les propriétés fonctionnelles des cellules T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  en s'affranchissant de l'aide apportée aux populations  $CD8^+$  par l'expression du bon corécepteur, nous avons mesuré la réponse des cellules MelA/A2-spécifiques à des doses graduelles de peptide en présence d'un Ac anti-CD8 bloquant (Fig. 53C). Le non-engagement du corécepteur CD8 se traduit par une baisse importante de la magnitude des réponses T  $CD8^+$ , mais pas  $CD4^+$ . Cette altération de la réponse fonctionnelle varie selon la population  $CD8^+$  considérée, et est corrélée à sa CD8-dépendance mesurée à l'aide de multimères de pCMH CD8null (p=0.012, r<sup>2</sup>=0.86, n=7). De façon intéressante, l'absence d'engagement du corécepteur CD8 abroge les différences fonctionnelles observées entre les populations T  $CD4^+$  et  $CD8^+$  (Fig. 53D), suggérant que les propriétés fonctionnelles de ces deux sous populations T ne diffèrent que par l'expression du bon corécepteur. Pour valider cette proposition, il serait intéressant d'introduire le gène  $Cd8\beta$  dans les cellules  $CD4^+$  et d'analyser les propriétés fonctionnelles des cellules  $CD4^+$  c



Figure 53: Contribution du corécepteur CD8 dans l'interaction TCR-pCMH et dans l'activation fonctionnelle du lymphocyte.

A. CD8-dépendance des populations T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> pour la fixation de multimères de complexes pCMH. Les histogrammes ont été obtenus après marquage de populations CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> par un multimère A2m (en bleu), CD8null (en rouge), ou A2m de spécificité irrelevante (en gris). B. Les résultats sont exprimés en ratio entre l'intensité de fluorescence du marquage par un multimère CD8null *versus* A2m. C. Dose-réponses de populations MelA/A2-spécifiques préalablement marquées par un Ac contrôle (panel du haut) ou anti-CD8 bloquant B9-11 (panel du bas) contre des cellules T2 chargées en concentrations peptidiques variables. D. Pourcentages de cellules T IFN $\gamma^+$  en présence ou non d'un Ac anti-CD8 bloquant après stimulation par des cellules cibles chargées en peptide (10  $\mu$ M).

## D. L'AVIDITÉ DES CELLULES CD4<sup>+</sup> POUR LE PCMH I DÉTERMINE LEUR ACTIVATION FONCTIONNELLE

Bien qu'elles expriment des TCR de forte affinité, engageant le multimère de complexe pCMHI de façon CD8-indépendante, certaines populations CD4<sup>+</sup> ne sont pas activées fonctionnellement par l'Ag. Ce déficit fonctionnel n'est pas intrinsèque ni dû à l'expression de récepteurs inhibiteurs. D'autre part, des tests fonctionnels sur des cibles présentant l'Ag et un Ac anti-CD4 ont suggéré que le déficit fonctionnel observé n'était pas dû non plus à l'absence d'engagement du corécepteur CD4 (non montré).

Un autre paramètre détermine donc la sensibilité à l'Ag des populations T CD4<sup>+</sup>. Pour adresser plus finement cette question, des clones PGT/A2-spécifiques ont été dérivés par dilution limitante de la populations N1. Tous les clones obtenus se lient au multimère PGT/A2 de façon peptide-spécifique et CD8-indépendante (Fig. 54A). Cependant, tandis que certains clones sont activés et produisent des cytokines en réponse à l'Ag, d'autres restent inactivés même à de fortes concentrations peptidiques (Fig. 54C, panel de gauche). Cette absence totale de réponse n'est pas due à un déficit intrinsèque de la cellule T à transduire un signal via son TCR ou à produire des cytokines (Fig. 54C, panel de droite). Pour évaluer la contribution de l'avidité des cellules T dans ces différences fonctionnelles, nous avons examiné la capacité de ces clones à fixer des multimères (c'est-à-dire des oligomères de complexes pCMH de forte valence) versus des tétramères (c'est-à-dire des oligomères de complexes pCMH de faible valence). Ces outils permettent de discriminer les cellules de forte avidité versus de faible avidité pour l'Ag (Guillaume et al., 2003; Neveu et al., 2006; Neveu et al., 2008). Tandis que les clones CD4<sup>+</sup> PGT/A2-spécifiques fonctionnels sont marqués à la fois par les tétramères et les multimères, les clones non fonctionnels ne lient que les multimères (Fig. 54B), indiquant que ces derniers présentent une avidité plus faible pour l'Ag. Les taux d'expression du complexe TCR/CD3 étant similaires à la surface de tous les clones (données non montrées), cette différence d'avidité reflète probablement une différence d'affinité des TCR pour PGT/A2.


Figure 54: L'avidité des clones CD4<sup>+</sup> pour le multimère de pCMH détermine leur activation fonctionnelle.

A. Histogrammes représentatifs obtenus après marquage des clones  $CD4^+$  par un multimère A2m (en bleu), CD8null (en rouge), ou A2m de spécificité irrelevante (en gris). Le clone 1 est non fonctionnel, le clone 2 est fonctionnel. B. Avidité des clones  $CD4^+$  exprimée en ratio entre l'intensité de fluorescence du marquage tétramère *versus* multimère. C. Les clones T PGT/A2-spécifiques ont été analysés pour leur capacité à produire du TNF $\alpha$  après stimulation par des cellules T2 chargées en doses variables de peptide (panel de gauche), ou par des cellules P815-A2 chargées avec des concentrations variables d'Ac anti-CD3 (OKT3) (panel de droite).

Ainsi, on peut proposer un schéma récapitulatif plaçant les différentes populations T étudiées sur un axe représentant l'affinité de leur TCR (Fig. 55). Les cellules T exprimant un TCR très affin sont capables d'être activées sans l'aide du corécepteur CD8 ; elles sont représentées par les clones CD4 PGT/A2-spécifiques fonctionnels, mais aussi par exemple par la population N3 CD8<sup>+</sup> MelA/A2-spécifique, qui reste activée malgré le blocage de l'engagement du CD8 par un Ac bloquant (Fig. 53C). De l'autre côté de l'échelle, on trouve les cellules qui ont absolument besoin de l'aide du corécepteur CD8 pour lier le multimère de pCMH (Fig. 53B) ou pour réagir fonctionnellement à l'Ag (Fig. 53C). Enfin, les cellules T CD4<sup>+</sup> non fonctionnelles expriment des TCR d'affinités intermédiaires, capables de lier les multimères sans l'aide du corécepteur CD8, mais non d'être activés par l'Ag.



Figure 55: Classement des populations T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> étudiées selon l'affinité de leur TCR.

E. QUELLE RELEVANCE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES CD4<sup>+</sup> CMH I-RESTREINTES ?

Au cours de l'étude de l'antigénicité des complexes pCMHI au sein des PBMC, nous avons montré que la composante Ag-spécifique CD4<sup>+</sup> pouvait être aussi fréquente que la composante CD8<sup>+</sup> dirigée contre le même Ag. C'est le cas en particulier du répertoire T antipp65/A2 (Fig. 56). Chez un donneur HCMV-séropositif, les deux composantes (CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) pp65/A2-spécifiques avaient subi une phase d'expansion clonale et un switch vers un phénotype mémoire (Fig. 57), suggérant que les deux sous populations peuvent être activées et recrutées au cours d'une réponse A2-restreinte contre un agent infectieux.



Figure 56: Fréquences de lymphocytes T naïfs spécifiques de différents complexes pA2 au sein des PBMC de donneurs A2<sup>+</sup> sains (Legoux et al., 2010).



Figure 57: Amplification et phénotype mémoire de la composante CD4<sup>+</sup> pp65/A2-spécifique chez un donneur A2<sup>+</sup> HCMV-séropositif.

Chez d'autres donneurs (donneur y par exemple), seule la composante Ag-spécifique  $CD8^+$  était recrutée dans la réponse anti-pp65/A2.

En accord avec cette hypothèse, des cellules CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'épitope tumoral tyrosinase présenté par le A2 ont été documentées au sein des lymphocytes infiltrants les tumeurs (Nishimura et al., 1999), et nous avons montré que les populations CD4<sup>+</sup> MelA/A2-spécifiques étaient capables de reconnaître *in vitro* des lignées de mélanome A2<sup>+</sup> exprimant l'Ag MelA (Fig. 58). D'autre part les populations T CD4<sup>+</sup>, stimulées avec un Ac anti-CD3 (OKT3) présenté par des cellules P815, présentent un profil Th1, et produisent en particulier

nettement plus d'IL-2 que leurs homologues CD8<sup>+</sup> (Fig. 59). Dès lors, il serait intéressant d'investiguer la possibilité que des cellules T CD4<sup>+</sup> procurent une aide aux réponses CD8<sup>+</sup> dirigées contre un même Ag CMHI-restreint.



Figure 58: Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont activées par des lignées de mélanomes.

Production intracellulaire de TNF $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  de cellules T MelA/A2-spécifiques CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> après incubation durant 5h avec des lignées de mélanome A2<sup>+</sup> exprimant (MelA+) ou non (MelA-) l'Ag MelA. Les pourcentages de cellules réactives sont indiqués.



**Figure 59: Profils cytokiniques des populations T CD4 et CD8 pCMHI-spécifiques.** Marquages intracellulaires des cytokines produites par les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> après incubation durant 5h avec des cibles P815 chargées avec un Ac anti-CD3 (OKT3) à 10 μg/mL.

#### F. CONCLUSIONS

Nous avons réalisé une analyse comparative des propriétés fonctionnelles des populations T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> dirigées contre différents Ag viraux ou tumoraux restreints par une molécule du CMH de classe I. Notre étude suggère que l'expression du bon corécepteur, en augmentant l'avidité des cellules CD8<sup>+</sup> pour le pA2, constitue le principal paramètre à l'origine des différences de réactivité fonctionnelle des deux sous populations T. Cette observation *in vitro* vient compléter l'analyse *ex vivo* des fréquences de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> A2-restreints, et notamment le fait que chez les donneurs A2 négatifs, les cellules T CD4<sup>+</sup> pCMHI-spécifiques soient à peine moins fréquentes dans le sang périphérique que les cellules T CD8<sup>+</sup> CD8-indépendantes (Legoux et al., 2010). Ces données suggèrent que la raison d'être des processus de choix de lignage CD4/CD8 ne serait pas d'orienter les thymocytes immatures selon la restriction au CMH de leur TCR, mais plutôt d'associer un programme fonctionnel (cytotoxique, helper...) à l'expression d'un corécepteur adapté.

Jean-Baptiste REISER\*, <u>François LEGOUX</u>\*, Dominique HOUSSET, Xavier SAULQUIN et Marc BONNEVILLE.

\*Co-premiers auteurs.

Manuscript en préparation

Nos données (voir parties Résultats II et III) suggèrent que la topologie du complexe pCMH détermine, avec les processus de sélections thymiques, la taille des populations T Agspécifiques dans le répertoire naïf. Pour investiguer plus avant les paramètres structuraux gouvernant l'antigénicité des complexes pCMH, les épitopes présentés précédemment (tableau 2) ont été cristallisés et leur structure tridimensionnelle déterminée, en collaboration avec l'équipe de D. Housset à Grenoble (Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel). Des variants peptidiques ont également été designés pour évaluer l'impact de la protrudance du peptide et de la mobilité de ses chaînes latérales sur son antigénicité. Au total, les structures de 18 peptides en complexes avec le HLA-A2 ont été résolues. En parallèle, les fréquences de cellules T naïves spécifiques de certains des complexes pCMH variants ont été déterminées, chez des individus exprimant ou non l'allèle HLA de restriction, en exploitant la technique d'enrichissement immunomagnétique précédemment décrite.

Les principaux résultats de cette étude sont résumés ici :

- La substitution d'un seul acide aminé du peptide peut modifier la position des chaînes latérales et/ou du squelette carboné d'une plus large partie de l'épitope. La caractérisation structurale de l'Ag est donc indispensable lorsque l'on souhaite évaluer l'impact d'un changement de résidu sur l'antigénicité d'un complexe pCMH.
- Les peptides les moins mobiles dans la poche du A2 (MelA et PGT) sont également les mieux reconnus par les cellules T naïves, en accord avec l'idée qu'une mobilité réduite favorise une interaction productive avec le TCR. Toutefois, la stabilisation de NS3 par mutations ponctuelles peut conduire alternativement à un élargissement ou une réduction de la taille du répertoire spécifique, indiquant que ce paramètre structural à lui seul ne suffit pas à assurer l'antigénicité d'un complexe pCMH.
- Le degré de protrudance du peptide n'est pas corrélé à son antigénicité dans le répertoire T naïf des individus exprimant ou non l'allèle HLA de restriction.

 La glutamine 155 du HLA-A2 est l'un des trois résidus du CMH de classe I systématiquement contacté par le TCR (Burrows, 2010). L'analyse de NS3/A2 et de ses variants révèle une importante diversité des positions pouvant être adoptées par ce résidu clef, et soulève la possibilité d'un rôle central de ces différentes conformations dans l'antigénicité du complexe pCMH.

En conclusion, nos données ont permis d'évaluer directement la contribution de différents paramètres structuraux potentiellement associés à l'antigénicité des complexes pCMH. Tandis que la protrudance du peptide ne gouverne pas la taille des populations T Ag-spécifiques, il semble que la mobilité du peptide entre les hélices  $\alpha$  du sillon du A2 contribue, mais de façon limitée, à l'antigénicité du complexe correspondant.

## What structural basis for pMHC antigenicity ?

Jean-Baptiste REISER\*, <u>François LEGOUX</u>\*, Dominique HOUSSET, Xavier SAULQUIN et Marc BONNEVILLE.

\*Co-first authorship.

## Introduction

T cells play a central role in vertebrate immune systems by protecting the organism against the proliferation of different infectious agents such as viruses, bacteria or protozoa as well as tumor cells. To achieve these goals, T cells display at their surface specific receptors, the abTCRs able to discriminate between peptide fragments derived from self or foreign proteins, presented by proteins coded by Major Histocompatibily Complex genes, the MHC molecules. Since 1996, with the structure determination of the first TCR-peptide-MHC complex in 1996 {Garboczi, 1996 #68;Garcia, 1996 #67}, our understanding of the TCR-peptide-MHC recognition process has taken a great step forward. Up to now, ~30 structures of such complexes are available in the protein data bank, including murine and human TCRs, class I and class II MHC molecules, syngeneic, allogeneic and xenogenic MHC molecules as well as self and nonself Ag peptides. They provide us with a structural insight into several key features of TCR-pMHC interaction such as TCR plasticity, MHC-restriction, cross-reactivity, allo-reactivity, immunodominance, autoimmune TCR recognition. Unfortunately and due to the extreme diversity of the TCRs, the versatility of the TCR for docking onto the pMHC and the exquisite sensitivity of this recognition event, these available structural data did not allow yet to establish the general rules governing a cognate TCR-pMHC interaction. As an illustration, only 3 MHC class I residues (65, 69 and 155) were identified as being involved in contacts with the TCR in all the TCR-pMHCI structures determined so far {Tynan, 2005 #69}. However, the contribution of these residues to the interaction varies from one TCR to another, and these residues do not constitute a conserved energetic hotspot for TCR docking {Burrows, 2010 #70}. They rather constitute a MHC triads the TCR can barely avoid to contact, given the structural constraints governing the TCR-pMHC docking.

Another approach used to shed light on the largely unknown rules governing TCR-pMHC recognition is to look at possible correlates between general structural characteristics of pMHC complexes and the nature of T cell repertoire specific for a given peptide pMHC. It may allow to obtain a much broader view of the impact of the pMHC structure on the T cell response, since looking at a few specific examples did not provide a clear picture of the TCR-pMHC recognition signature. Several indicators of the efficacy of the T cell immune response, such as the ability of the peptide antigen to be efficiently displayed by MHC molecules, the frequency of T cells reactive to a given pMHC complexes or the avidity of T lymphocytes for the cells presenting a given antigen (Ag) can be correlated with structural and thermodynamic properties of pMHC.

As an example, recent structural data suggest that the diversity of the repertoire of T cell specific for a given pMHC complex is correlated with the solvent accessibility of the MHC-bound peptide. By comparing the diversity of a T cell repertoire subset specific for peptides presented by H-2Db, Doherty and collaborators found out that a featureless peptide from influenza, NP366, was selecting a much less diverse T cell repertoire, along with the emergence of public TCR usage. Contrastedly, a much more proeminent influenza peptide, PA224, was shown to select a diverse T cell repertoire. Analysis of a PA224 mutant, in which the protruding arginine in position 7 was replaced by an alanine, showed that the reduced protrudence of the variant was also associated with a reduced diversity of the selected T cell

repertoire {Turner, 2005 #5}. However, the general character of this hypothesis remains to be established.

Up to now, very little was known about the characteristics of any Ag specific naive T cell repertoire, essentially because of the low frequency (in the  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  range) of specific T lymphocytes. In 2007, Jenkins and collaborators have developed a new method allowing the ex vivo measurement of the frequency of murine naive T cells specific for a given pMHC. They showed that the frequency of naive T cell was strongly correlated with both the repertoire diversity and response magnitude {Moon, 2007 #65}. This approach was then adapted to human {Legoux, 2010 #27} and opened up new investigations of possible correlates between the frequency of naive T cells specific for a given pMHC and overall structural characteristics of this pMHC.

Here, we present ex vivo frequency measurements and structural characterizations of several viral and tumoral peptides, presented by the HLA-A\*0201 MHC class I molecule. As the naive repertoires specific for the set of peptides studied cover a wide range of frequency ( $10^{-2}$  to  $10^{-6}$ ), we have gathered for the first time a unique set of data on pMHC antigens to tackle the structural bases of pMHC immunogenicity.

## Results

#### Structure determination of viral and tumoral peptides in complex with HLA-A2

In order to identify possible general correlates between structural properties of a pMHC complex and the frequency of specific naive T cell, we have solved the crystal structure of several viral and tumoral peptides as well as some of their variants, in complex with HLA-A2. The list of peptides includes a immudominant epitope of human cytomegalovirus (HCMV) pp65 tegument protein, pp65<sub>495-503</sub> (NLVPMVATV, from now on referred to as NLV), one epitope from Epstein-Barr virus (EBV), bmlf1<sub>280-288</sub> (GLCTLVAML referred to as GLC), three epitopes from hepatitis C virus (HCV), NS3<sub>1073-1081</sub> (CINGVCWTV referred to as CIN), NS31406-1415 (KLVALGINAV referred to as KLV), NS4b1807-1816 (LLFNILGGWV referred to as LLF), one tumoral peptide from the a-fetoprotein, APF<sub>137-145</sub> (PLFQVPEPV referred to as PLF), a modified decapeptide from Melan-A Mart1 protein Mart1<sub>26-35</sub> (ELAGIGILTV referred to as ELA), and a decapeptide from the human prostaglandin transporter,  $pg_{178-187}$ (LLAGIGTVPI, referred to as LLA), identified recently as a Melan-A MART1 analogue {Dutoit, 2002 #76}. These structures of wild type peptides or variants complement the structures already present in the Protein Data Bank (wild type NLV: 3GSO, {Gras, 2009 #29}; wild type (EAA) and modified (ELA) melan-A/MART1: 2GT9, {Borbulevych, 2007 #78}, 1JF1, {Sliz, 2001 #77}). Overall, the crystal structures of eighteen pMHC copmplexes have been refined at a resolution ranking from 1.1 Å (GLC-HLA-A2) to 2.35 Å (ELA<sub>I5W</sub>-A2) that is sufficient for the determination of structural characteristics such as the peptide bulginess, accurate positioning of the side chains and thermal motion assessment (see Table S1 for details). The overall structure of the HLA-A2 molecule is very similar in all the peptide-A2 complexes determined in this study and comparable to those already present in the PDB. For all the structures, there was no ambiguity in interpreting the electron density for the peptide backbone. According to the conformation of the peptide backbone in the A2 peptide binding groove, the 18 structures solved can be split into 5 different groups. 3 families of conformation can be identified for nonapeptides (1:NLV-A2, CIN-A2, PLF-A2; 2: GLC-A2, 3: NLV<sub>V6C</sub>-A2, NLV<sub>V6G</sub>-A2, CIN<sub>G4M-V5W</sub>-A2, see fig. 1A) and two for decapeptides (1: ELA-A2, LLA-A2, KLV-A2; 2: LLF-A2, see fig. 1B). Among all the peptide variants studied, most of them adopted a conformation very similar to that of the wild type peptide, but four of them adopted a different conformation at position 4-6: CIN<sub>G4M-V5W</sub>-A2, NLV<sub>V6C</sub>-A2, NLV<sub>V6G</sub>-A2 defining the third family of backbone conformations for nonapeptides (Fig. 2C) while GLC<sub>T4P</sub>-A2 adopt a conformation similar to that of NLV-A2 (Fig. 2D). This observation highlights the significance of structural characterization when one aim at evaluating the

impact of peptide amino acid changes on immunogenicity: some amino acid modifications change the register of side chains that is presented to the TCR and strongly impact a large portion of epitope. The change in the immunological properties of these variants may therefore be due to structural changes at positions different from the position mutated. In order to widen our studies, frequency data were also collected on three well studied T cell epitopes for which the crystal structure was already known: MP<sub>58-66</sub> from influenza (GILGFVFTL, pdb entry 1HHI), HIV p17 GAG (SLYNTVATL, pdb entry 1T21) and minor histocompatibility antigen HA-1 (VLHDDLLEA, pdb entry 3FT3). The backbones of HIV p17 GAG and HA-1 peptides have a conformation similar to NLV (Fig. 1C) while MP<sub>58-66</sub> has conformation closer to that adopted by GLC (Fig. 1D).

#### No noticeable correlation between peptide bulginess and frequency of specific naive T cells

As Doherty and collaborators showed that in one case a correlation could exist between the peptide bulginess and the diversity of the T cell repertoire specific for the given pMHC, we have investigated whether this observation could be generalized to more pMHCs. As the frequency of naive specific T cell has been shown to be a good indicator of the diversity of such a repertoire {Moon, 2007 #65}, we have evaluated the frequency of naive specific T cells for several peptides presented by HLA-A2 (Fig. 3). These data have been gathered with different structural characteristic of the peptides derived from crystallographic structures in Table 1. As shown in Fig. 3, there is no obvious correlation between the solvent exposed surface of the peptide and the frequency of naive T cells specific for a given peptide. The most frequent T cells are observed for ELA and PGT, for CD8+ and CD4+ T cells and regardless of the presence of A2, while their exposed surface is within the average for nonaand decapeptides  $(300 - 320 \text{ Å}^2)$ . Low frequency values are observed for both the most buried and the most bulgy peptide. This observation does not support the concept that a larger peptide solvent exposed surface does constitute recurrently a significant advantage for being recognized by T cells. It thus suggests that other structural parameters have to be taken into account, such as improved complementarity of TCR and pMHC surfaces, mobility of the peptide. Since the two peptides for which the frequency of naive T cells is the highest are self peptides (Fig. 3), one may also consider the impact of the presence of the antigen peptide during the selection process.

#### Impact of grafting bulky residues at positions exposed to the TCR

In order to further investigate the impact of the peptide bulginess, we aimed at increasing the bulginess of a peptide for which the frequency of specific T cell is already high by substituting bulky side chain residues to small one at positions that were accessible to the TCR. With this aim, the isoleucine at position 5 of the ELA peptide was replaced by a tryptophan. The structure of the ELA<sub>15W</sub> variant confirmed that the tryptophan side chain was actually exposed to the solvent, leading to a 64  $Å^2$  increase of the peptide solvent exposed surface (Fig. 2B). This modification lead to a drastic decrease of the frequency of naive specific T cells by a factor of 60 (Fig. 3). Our observation appears to be at odds with previous data in which the same variant was shown to be able to activate 5 out 7 ELA-A2 specific T cell clones {Douat-Casassus, 2007 #39}. In the crystal structure of the Mel5-TCR-ELA-A2 complex {Cole, 2009 #59}, the isoleucine side chain in position 5 is caged between CDR1a, CDR2a and CDR3b. Modeling a tryptophane at this position would cause steric clashes with either the A2 a2 helix, the CDR3b ot the CDR1a, depending on the rotamer choosen. As the T cell repertoire specific for MART1<sub>26-35</sub> shows a marked biased usage of TRAV12-2 germline segment, one can expect a conserved docking mode of the TCR Va domain onto the ELA-A2 complex. Therefore, the nature and the length of the CDR3b may dictate the degree of tolerance for amino acid substitution at position 5. In the present case, the I5W substitution seems tolerated by some of the ELA specific clones, likely thanks to the presence of a larger pocket at CDR3 loops interface. However, the drastic drop in the frequency (Fig. 3) suggest that this type of clones only represents a small fraction of the ELA specific T cell repertoire.

#### Is the mobility of the peptide connected with the frequency?

Another parameter that can influence the antigenicity of a given pMHC is the mobility of the peptide within the MHC peptide binding groove. The interaction between the TCR and a given pMHC is often associated with significant conformational changes of the CDR loops and a negative entropic contribution to the free energy of binding. Moreover, the affinity of the TCR for a cognate pMHC is rather low, in the range 1-100 µM {Rudolph, 2006 #71}. Therefore one can expect that a less mobile peptide could favor the TCR binding as it would reduce the entropic cost of stabilizing the peptide. Whether this contribution might play a significant role remained to be assessed. By comparing the average thermal motion of the HLA-A2 a-helices and the peptide, we can estimate how well the peptide is anchored in the MHC peptide binding groove. The relative B-factor as defined in Table 1 is positive if the peptide is more mobile than the  $\alpha 1-\alpha 2$  A2 helices, and negative if it is less mobile. For the three peptide-A2 complexes for which the structure of a complex with a TCR is available in the PDB (JM22-MP58-66-A2 {Stewart-Jones, 2003 #20}, RA14-NLV-A2 {Gras, 2009 #29}and Mel5-ELA-A2 {Cole, 2009 #59}), the relative B-factor of the peptide is either negative or very close to 0, showing that in the ternary complex the peptide mobility is lower or equal to that of the  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  A2 helices. For the corresponding binary complexes, the relative B-factor is positive, ranging from 6 to 72, and illustrating the stabilization of the peptide upon TCR binding. By plotting the relative B-factor of the peptide as a function of the frequency of naive T cell specific for the given peptide, we observe no clear correlation that could identify the mobility of the peptide as a general parameter governing the antigenicity of the pMHC. However, one can point out that the two highest frequency values occur for peptides that are very well anchored in the MHC groove (ELA<sub>wt</sub>-A2 and LLA-A2). Thus, if not obviously correlated, the reduced mobility may still represent a plus for a productive interaction with T cells. For medium range frequency, the role of the mobility seems less obvious. As exemplified by the CIN peptide and two of its variants: CIN<sub>N3S</sub>-A2 and CIN<sub>C6V</sub>-A2 are both more mobile that the wild type peptide, while the frequency of specific T cell is ten times less for the first variant and two times more for the second (Table 1). This tells us that other parameters are likely to overcome the impact of the peptide mobility, as discussed below.

#### Bases for the different frequency of T cells specific for either NLV or CIN

In our approach to understand the bases that could govern the immunogenicity of different peptide-A2 complexes, we have looked in more details at NLV-A2 and CIN-A2. NLV and CIN are nonapeptides that adopt a similar conformation in the HLA-A2 peptide binding grouve (Fig. 2A), the CIN peptide being just slightly more buried in the MHC groove, especially in the central region of the peptide where positional difference reaches 0.9 Å (C $\alpha$ distance at position 6). Therefore, the difference in immunogenicity observed for these two peptides is likely to originate from the nature of the side chains. We thus designed variants of these two peptides by grafting CIN residues on NLV and vice versa. The structural data obtained tells us that depending on the sequence modification, the two peptides can switch between two conformations and that the contribution of each position to the stability of one conformation is not independent from the others. Indeed, the valine at position 6 contributes significantly to the conformation stability of NLV. When changed to either glycine or cysteine (amino acid at postion 6 in CIN), the peptide conformation changed in such a way that the methionine at position 5 becomes buried in the MHC groove while the side chain at position 6 becomes exposed to the solvent (Fig. 1A and 2C). This was quite unexpected as the cysteine at position 6 in CIN is buried and seems to serve as a secondary anchor as does the valine 6 in NLV. This suggests that the conformation stability of NLV rely on the fact that exposing the Val6 to the solvent would be energetically too costly. But as soon as you change it by a less hydrophobic amino acid, it might be more easily exposed, leading to a conformational change.

Grafting a methionine on CIN in position 5 led to a small conformational change but also to a significant move of the central region of the peptide (C $\alpha$  distance at position 6 is 2.1 Å) outside of the A2 peptide binding groove, while the methionine side chain is exposed to the solvent, as in NLV (Fig. 2E). This suggests that the cysteine at position 6 is not as efficient as the value in NLV to form a secondary anchor. Since Val5 of CIN is already significantly exposed to the solvent (70 Å2, Table S2), a rational for such a shift is no obvious. The fact that a value at position 5 in the peptide conformation adopted by the CINV5M variant would be even more exposed to the solvent may play a role.

The tryptophan side chain at position 7 in CIN is in close contact with the A2  $\alpha$ 2 helix, and is further stabilized by a hydrogen bond with Gln155. Thus, it may be involved in stabilizing the peptide into the groove. In order to assess the impact of such contacts in the stability of the peptide, we have mutated Ala7 of NLV into a histidine. In the NLV<sub>A7H</sub> structure, this histidine side chain is hydrogen bonded to the side chain of A2 Gln155 and stacked on A2 Val152, as is the tryptophan in CIN. The analysis of the B factors shows that the histidine has slightly reduced the mobility of the C-ter backbone of the peptide (residue 7 to 9). However, the mobility of the N-ter part of the peptide increased significantly (Table S2). It seems that the bulkier histidine side chain generate a slight change of peptide conformation that propagates to the N-ter part of the peptide, slightly destabilizing it. For the C-ter end, the increased number of contacts at position 7 truly limits its mobility. However, as NLV-A2 specific TCR closely interact with residue 4 and 5, we do not expect a favorable impact the frequency of specific T cells.

Two variants of CIN are also very intriguing. The N3S variant was designed to break two hydrogen bonds that tight the CIN peptide to the Gln155 residue by a side chain – side chain interaction. Indeed, this mutation lead to an overall increased peptide mobility (Table 1) and a displacement of the central region of the peptide by 1.5 Å outside of the MHC groove, reminiscent of the displacement observed for the V5M variants, albeit less pronounced (Fig. 2E). The mutation is associated with a drastic decrease of the frequency of specific T cells (10 times).

The C6V CIN variant was designed to graft the amino acid found at position 6 in NLV on CIN. We observe a 1.3 Å displacement of residue 6 and 7 towards the outside of the groove, that seems driven by a steric hindrance with A2 residue 69, 70 and 73 that would have occured with the bulkier valine side chain, if the peptide position was kept unchanged. As a consequence, this variant is less buried in to A2 peptide binding groove, as indicated by the increased solvent exposed surface (295 Å<sup>2</sup> instead of 252 Å<sup>2</sup> for the wild type CIN peptide). Despite the fact that the valine acts as a secondary anchor, as in NLV, the mobility of the peptide is higher than that of the wild type peptide. Quite surprisingly, the frequency of T cells specific for this peptide variant is two times higher than the one observed for the wild type peptide (Fig. 3). The other intriguing observation is that this variant superposes very well to the N3S variant, although the two mutants differ quite much in activating the naive T cell repertoire (Fig. 3). The position of the position of the Val5 in the C6V mutant is closer to that of the wild type peptide (Fig. 2F), supporting a more similar activating capacity. Despite the positional shift observed at position 6, the Val seems a better secondary anchor than a cysteine, and may therefore improve the stability of the peptide conformation. However, Bfactor and electron density analysis suggest that the thermal motion in the central region for the CIN wild type peptide and their variants is similar. The N3S mutation impact slightly the position of residue 1 and 2 as well as the conformation of tryptophane 167 of the  $\alpha 2$  A2 helix. This may have an impact on the strength of the primary anchor, as illustrated by the omit map electron density level that is much lower for position 1 in N3S variant (Table S2). The looser binding of the N-ter end of the peptide may impair its recognition by T cell. The position of the Trp7 side chain is also significantly impacted by the modification of position 3 and 6. The overall displacement of the side chain outside of the groove reaches 2.6 Å and 4.6 Å for the  $CIN_{C6V}$  and  $CIN_{N3S}$  variants and further illustrated by the increased solvent exposed surface of the side chain (Table S2 and Fig. 2E and 2F). As this Trp7 side chain displacement has a significant impact on the pMHC surface, a role in the change of specific T cell frequency observed is plausible. Last, the A2 Gln155 also adopts different position. In the wild type CIN-A2 structure, the Gln155 side chain forms two hydrogen bonds with the side chain of CIN Asn3 and is also at hydrogen bond distance from the Trp7 Ne1 atom. In the CIN<sub>C6V</sub>, there is a 2.3 Å shift of the amine group. One hydrogen bond with CIN Asn3 is maintained while the one with Trp7 is lost. In CIN<sub>N3S</sub>, the Gln155 conformer is completely different, with its amine group pointing outside of the peptide binding groove and forming no hydrogen bonds with the peptide. As Gln155 is one of the three MHC class I residue that have been always seen to be contacted by the TCR {Burrows, 2010 #70}, one cannot exclude that the repertoire of specific T cell may depend on the conformation this central A2 residue.

### Discussion

One of the much debated questions regarding T cell receptor recognition of peptide-MHC complexes is whether some structural signatures of an efficient T cell response can be identified. In the present study, we have looked for possible connections between structural characteristics of a few different class I pMHC complexes and the frequency of naive specific T cells in the whole T cell repertoire. One of the first findings is that there seems to be no correlation between the peptide bulginess and the frequency of naive specific T cells. The most buried peptide (CIN) presenting a quite featureless pMHC surface to the TCR, is associated with a rather high frequency of naive specific T cells. The highest frequency is observed for a peptide (ELA, LLA) the protrudence of which is significantly lower that the one of peptides that are the least immunogenic (NLV, HA-1). Moreover, grafting a bulky residue on ELA, increasing the solvent exposed surface by 20% led to a decrease of the frequency of specific T cells by a factor of 60. In this context, the observations made by Turner et al {Turner, 2005 #5} on two inluenza peptides presented by the murine MHC molecule H-2D<sup>b</sup> cannot be generalized. The sensible concept that the number of TCR able to productively interact with a featureless pMHC surface might be significantly lower, due to the need of specific aminoacids and a specific spatial distribution to interact a buried peptide, previously illustrated by the recognition of the influenza antigen MP<sub>58-66</sub>-A2 by the immunodominant public TCR JM22 {Stewart-Jones, 2003 #20}, does not seem to be compatible with out data which clearly shows that the response to buried peptides can some time be diverse. A possible explanation may rely on the relatively week affinity of the TCR for its cognate pMHC. An affinity range of 1 to 100  $\mu$ M is equivalent to a  $\Delta$ G range of 5 to 8 kCal/mol corresponding to the free energy of one hydrogen bond. It is therefore not unlikely that the T cell response to any given antigen and the structural solution supporting it might be generally diverse, as it does neither require a perfect structural fit nor a dense network of interaction over the whole interface. Nevertheless, for some antigens, it may append that one peculiar V(D)J recombination constitutes a optimal solution that lead to a "public" type of response, but this is not necessarily linked with a lower protrudence of the peptide.

The analysis of a possible connection between the mobility of the peptide and the frequency of specific T cells lead also to the conclusion that there is no systematic correlation. However, a few observations suggest that an increased stability favors a high frequency of specific T cells. Among the peptides studied in the present work, the one that activate the most frequent T cell population are also the less mobile, according to their overall relative B-factor (Table1). Moreover, TCR docking is always associated with a significant decrease of the peptide mobility, especially in the central region (Tables 1 and S2), highlighting the energy cost for stabilizing the peptide. However, as shown for the CIN peptide and one of its variants, the

most mobile peptide is not always the most immunogenic. These observations suggest that the mobility of the peptide is a genuine parameter governing the immunogenicity of the peptide, albeit with a limited contribution. The fact that T cells specific for the  $CIN_{C6V}$  variant are more frequent than those specific of the wild type peptide cannot be fully rationalized even if the observed differences on the peptide surface presented to the TCR certainly have a significant impact that remains to be quantified. It also highlights the need to identify the parameter governing the frequency.

In 2009, Legoux et al {Legoux, 2010 #27} have analyzed the frequency CD8+ and CD4+ naive T cells specific for several pMHC (ELA-A2, CIN-A2, NLV-A2, SLY-A2) in A2+ and A2- individuals. They observed that hierarchy of frequencies between peptide antigens was overall well conserved for CD8+ and CD4+ T cells as well as for A2+ and A2- individuals. Since they could demonstrate that naive CD4+ T cells were not selected by MHC class I molecule in thymus, they reasonably argued that the measured frequency of naive CD4+ T cells, ranging from 5  $10^{-7}$  to 7  $10^{-6}$  (Table 1), was a fair evaluation of the cross reactivity of the repertoire for a given antigen, regardless of the co-receptor. The influence of the CD8 corecptor was also assessed by comparing CD4+ and CD8+ T cell frequencies in A2individual, and an increase by a factor ranging from 5 to 25 was determined, depending on the antigen. Then, the comparison of the frequency of CD8+ T cells for A2+ and A2- individuals allowed to assess the impact of the presence of the peptide during the thymic selection process. Heterogeneous results were obtained among the peptides studied. For ELA and LLA, the presence of the A2 haplotype was associated with an 10 times increase in the frequency while it had no impact on the percentage of high avidity specific T cells. This suggested that ELA and LLA could be present in the thymus, albeit at low level as no deletion of high avidity T cell clones is observed. For NLV and CIN<sub>N3S</sub>, a slight or a significant decrease was observed between A2+ and A2- individuals suggesting that neither the NLV peptide nor a close homologue is present in the thymus. The positive or negative impact, illustrated by the frequency ratio between A2+ and A2- individuals, has been shown to be correlated with the percentage of naive cells among T cells specific for a given pMHC {Legoux, 2010 #27}. One possible explanation of this correlation could be that T cell clones specific for some pMHC (e.g. NLV-A2 or  $CIN_{N3S}$ -A2) could be more crossreactive with other self- or environmental peptides antigens. This cross-reactivity could lead to the negative selection of many specific T cell clones in the thymus and to the activation of numerous specific T cells in the periphery. This seminal study, complemented by the structural and frequency data presented here may allow to define a few parameters underlying the frequency of naive T cells specific for a given antigen.

First, the pMHC bears an epitope that is more or less prone to be recognized by the repertoire of T cells. ELA-A2 and LLA-A2 clearly possess a structural motif involving both the MHC and the peptide that is recognized by a larger fraction of the T cell repertoire. The bias towards the usage of the TRAV12-2 gene segment observed in TCR productively interacting with these two pMHCs suggest a possible role of a co-evolution of TCR and pMHC for this preponderance to interact with TCR. In that case, such phenomena would be restricted to selfpeptides or to foreign peptides sharing a significant degree of homology with a self peptide. As an example, CIN<sub>C6V</sub>-A2 epitope may possess a motif that is also found in a self peptide-A2 complex, conserved throughout evolution and involved in the thymic selection. The lowest CD4+ naive specific T cell frequency is observed for SLY and CIN<sub>N3S</sub> (5  $10^{-7}$ ), that may represent the basal cross-reactivity level, indicating that at least about 50 clones could react to any pMHC, on the base of an estimate of 10<sup>-8</sup> different clones present in the periphery. Whether such a predisposition to be recognized by TCR is generally associated with a biased usage of one TRAV or TRBV segment remains to be further documented. The fact that the CD4+ naive specific T cell frequency for ELA and LLA is similar while the contribution of T cell clones using TRAV12-2 segment differ significantly (80% for ELA and 40% for LLA) suggests that such a bias is not necessary.

Second, the presence of the proper co-receptor, CD8 for class I MHC molecules, is quite expectedly always associated with an increase of the frequency. However, the amplitude of this increase is quite heterogeneous. The largest increase (factor between 20 and 25) is observed for ELA, LLA, GIL and two CIN<sub>N3S</sub> and CIN<sub>C6V</sub> variants). Intermediate values (10 to 15 times) is observed for CIN, ELA<sub>15W</sub> and VLH. Lowest values (facteur 5) are observed for NLV and SLY. According to what is known about CD8-MHC interactions, an influence of the pMHC structure on the ability of the CD8 to interact with the  $\alpha$ 3 domain of the MHC is unlikely. However, the percentage of naive T cell in the specific repertoire may impact this factor. The % of naive cell, measured in A2+ individuals correlates well with the factor of frequency increase due to the presence of CD8 in A2- individual. As the crossreactivity of a given specific T cell repertoire for other self or environmental peptides is a priori not strictly A2 restricted, such a correlation is unlikely a coincidence. Indeed, the lowest factors are observed for NLV and SLY for which the percentage of naive specific T cells is also the lowest.

Third, the presence of the peptide or a related one in thymus, seems to really positively impact the frequency, as observed for ELA, LLA and CIN. As previously proposed {Legoux, 2010 #27}, the presence in low amount of the peptide in the thymic antigen presenting cells may favor the positive selection of sufficiently high avidity specific T cells, biasing the selected repertoire for the recognition of this self peptide. Such an effect would be restricted to self peptide (ELA or LLA) or to foreign peptides that possess a significant homology with a self peptide involved in the positive selection (possibly the case for CIN, but the homologous self peptide remains to be determined). The ratio between CD8+ naive specific T cell frequencies in A2+ and A2- individuals, when above one, is likely a good indication of the degree of homology with a selecting and may be used to guide peptide modifications that aims at increasing its immunogenicity.

Fourth, the propensity of naive T cells specific for a given pMHC to crossreact with other self- or environmental peptide antigens could clearly modulate the overall frequency of naive specific T cells. The percentage of naive T cells in the specific T cell repertoire, the ratio of CD4+ and CD8+ naive specific T cell frequencies in A2- individuals, and the ratio of CD8+ naive specific T cells in A2+ and A2- individuals are influenced by the crossreactivity potential of the specific repertoire towards self and environmental peptides, either presented by A2 or non A2 MHC molecules. As mentioned above, such a cross reactivity can lead to the deletion of specific T cell clones during the negative selection process and to activation of T cell clones in the periphery. Clearly,  $CIN_{N3S}$  and to a lesser extend NLV and SLY show a CD8+ naive specific T cell frequency are either lower in A2+ individuals than in A2- ones or almost similar. It thus suggests that CIN<sub>N3S</sub>, NLV and SLY specific T cells crossreact with self or environmental antigens presented by A2. This is confirmed by the percentage of naive within the repertoire of T cells specific for these two peptides, in A2+ individuals. However, according to the ratio of CD8+ and CD4+ naive specific T cell frequencies, the crossreactivity seems restricted by A2 for CIN<sub>N3S</sub>, while for NLV and SLY, T cells seems also able to crossreact with non-A2 restricted antigen. The T cell repertoire specific of SLY seems also to crossreact with other self and environmental antigen, in a manner that is restricted by both A2 and not A2 MHC. In this case, the similarity of the CD8+ naive specific T cell frequency in A2+ and A2- individuals may be explained by a compensatory effect between of a negative crossreactivity impact and a positive effect due to a possible homology with a selecting peptide that remains to be determined. Whether there exist a relationship between the pMHC structure and the propensity of the T cell repertoire to crossreact with other self and environmental peptide antigens remains to be investigated. So far, this behavior was not observed for self-peptides.

Methods

References

Table

Table 1 : Peptide solvent accessible surface, overall mobility, frequency of HLA-A2/peptide specific T cell in the naive repertoire. The relative B-factor is calculated as :  $100 \times (\langle B \rangle_{peptide} - \langle B \rangle_{HLA-A2 \ ala{}^{0}2}) / \langle B \rangle_{HLA-A2 \ ala{}^{0}2}$ . \* indicates variants for which a conformational change was observed, in comparison to the wild type peptide.

			_	_						
	PDB entry code		Peptide solvent	Mobility of A2 a1a2	Mobility of the nentide	Relative mobility of	Frequency of peptide	Frequency of peptide	Frequency of peptide	Frequency of peptide
			surface	helices ( <b>,</b>	( <b>, main chain</b>	(main chain /	naive CD8 <sup>+</sup> T cell (x 10 <sup>-</sup>	naive CD4 <sup>+</sup> T cell (x 10 <sup>-</sup>	naive CD8 <sup>+</sup> T cell (x 10 <sup>-</sup>	naive CD4 <sup>+</sup> T cell (x 10 <sup>-</sup>
				main chain	/ side chain)	side chain)	2) ( <sub>2</sub>	<sub>2</sub> ) (	<sub>2</sub> ) (	<sub>2</sub> )
				chain)	Î					
			${ m \AA}^2$	${ m \AA}^2$	$Å^2$	%	A2 <sup>+</sup> individuals		A2 <sup>-</sup> individuals	
pp65495-503 (NLVPMVATV)	3GSO	NLV <sub>wt</sub> -A2	360	15.2 / 17.0	16.2/17.9	6.5 / 5.8	$0.35 \pm 0.30$	$0.20 \pm 0.25$	$0.64 \pm 0.64$	$0.14 \pm 0.17$
	3MR9	NLV <sub>M5A</sub> -A2	275	22.2 / 21.7	21.5/22.1	-3.1/1.9				
	3MRB	NLV <sub>A7H</sub> -A2	293	15.8 / 16.9	19.0/22.1	20/31				
	3MRC	NLV <sub>V6C</sub> -A2 *	277	17.6 / 19.3	24.7/27.5	41/40				
	3MRD	NLV <sub>V6G</sub> -A2 *	251	15.5 / 18.7	26.3 / 26.3	70 / 41				
	3GSN	RA14-NLV <sub>wt</sub> -A2	40 (368)	44.4 / 40.7	37.1/37.3	-16/-8.3				
NS3 <sub>1073-1081</sub> (CINGVCWTV)	3MRG	CIN-A2	252	11.5 / 13.3	16.6/17.4	44/31	$4.0 \pm 2.3$	$0.13 \pm 0.084$	2.1 ± 1.9	$0.16 \pm 0.13$
	3MRH	CIN <sub>N3S</sub> -A2	323	41.4/39.2	62.9 / 63.8	52 / 63	$0.45 \pm 0.32$	0.18	$1.1 \pm 0.79$	$0.046 \pm 0.039$
	3MRI	CIN <sub>G4M-V5W</sub> -A2 *	306	36.4 / 34.4	42.9/43.9	18/28				
	3MRJ	CIN <sub>V5M</sub> -A2	337	24.2 / 24.5	36.3/36.7	50 / 50				
	3MRL	CIN <sub>C6V</sub> -A2	295	29.4 / 29.0	50.6 / 51.0	72 / 76	<b>8.5 ± 3.9</b>	$0.24 \pm 0.12$	7.3 ± 3.8	$0.31 \pm 0.17$
MART1 <sub>26-35</sub> (Elagigiltv)	1JF1	ELA-A2	322	19.2 / 23.5	20.7/23.7	0.0 / 9.L	$60 \pm 30$	$0.68 \pm 0.27$	12 ± 8.3	$0.52 \pm 0.20$
	3MRO	ELA <sub>ISW</sub> -A2	386	14.4 / 14.1	16.0/16.3	11/15	$1.06 \pm 0.85$	$0.038 \pm 0.029$	$0.39 \pm 0.28$	$0.031 \pm 0.019$
	3MRP	ELA <sub>I5L-L8N</sub> -A2	328	32.3/31.8	33.1/34.2	2.6 / 7.6				
	3HG1	MEL5-ELA-A2	53 (309)	33.1 / 33.3	34.0/33.9	2.8 / 1.8				
pgt <sub>178-187</sub> (LLAGIGTVPI)	3MRR	LLA-A2	306	29.9 / 30.0	35.1/34.3	17 / 14	43 ± 27	$0.37 \pm 0.13$	$11.8 \pm 7.0$	$0.63 \pm 0.26$

NS3 <sub>1406-1415</sub> (KLVALGINAV)	3MRM	KLV-A2	377	16.7 / 16.4	18.7/20.3	12 / 24				
NS4b <sub>1807-1816</sub> (LLFNILGGWV)	3MRN	LLF-A2	395	22.1 / 20.9	17.9 / 16.4	-19 / -22				
bmlf1 <sub>280-288</sub> (GLCTLVAML)	3MRE	GLC-A2	327	8.3 / 9.6	12.0 / 13.5	45 / 40				
	3MRF	GLC <sub>T4P</sub> -A2*	309	15.4 / 15.3	24.9/27.0	62 / 76				
afp <sub>137-145</sub> (PLFQVPEPV)	3MRK	PLF-A2	319	13.6 / 14.9	18.1 / 20.1	33 / 35				
MP <sub>58-66</sub> -A2 (GILGFVFTL)	1HHI	GIL-A2	250	21.7 / 20.7	27.2 / 25.7	72 / 75	$1.52 \pm 1.24$	$0.064 \pm 0.044$	2.3 ± 3.4	$0.12 \pm 0.10$
	10GA	JM22-GIL-A2	35 (255)	23.4 / 24.9	17.8/19.2	-23.9 / -23.1				
HIV p17 gag (SLYNTVATL)	1T21	SLY-A2	319	29.4 / 29.0	50.6 / 50.8	25 / 24	$0.35 \pm 0.20$	$0.055 \pm 0.057$	$0.31 \pm 0.20$	$0.057 \pm 0.042$
HA-1 (VLHDDLLEA)	3FT3	VLH-A2	386	18.7 / 19.6	22.0 / 22.8	18 / 16	$0.23 \pm 0.18$		$0.46 \pm 0.53$	$0.045 \pm 0.050$
Tyrosinase (YMDGTMSQV)							$1.46 \pm 0.88$	0.04 ±0.028	$0.42 \pm 0.22$	

## Figures



**Figure 1**: peptidic conformations in the A2 binding groove. Peptides are shown as sticks. A2 helices are shown as ribbons. A. Three families of conformations can be identified for nonapeptides: NLV, CIN and PLF (in blue); GLC (in yellow); NLV<sub>V6C</sub>, NLV<sub>V6G</sub> and CIN<sub>G4M-V5W</sub> (in pink). B. Two conformational groups were identified for decapeptides : ELA, LLA and KLV (in grey). LLF (in green). C. The backbones of HIV p17 GAG (in green) and HA-1 (in brown) peptides have a conformation similar to NLV (in blue). D. MP<sub>58</sub> (in pink) has a conformation close to that adopted by GLC (in yellow).



**Figure 2** : A. NLV and CIN adopt a similar conformation in the HLA-A2 peptide binding grouve. B. ELA<sub>15W</sub> shows a greater bulginess thant ELA. C. Peptide variants adopting a different conformation compared to wild-types :  $CIN_{G4M-V5W}$ ,  $NLV_{V6C}$  and  $NLV_{V6G}$ . D.  $GLC_{T4P}$  (in pink) and NLV (in orange) adopt a very similar conformation. E. Conformational changes upon grafting a méthionine on CIN in position 5.



**Figure 3 :** Relationship between naive Ag-specific CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cell frequency (10<sup>-5</sup>) and peptide solvent exposed surface (Å<sup>2</sup>). Naive Ag-specific T cell frequencies were measured as described previously (Legoux et al., 2010), with the following antigenic specificities: ELA and ELA<sub>I5W</sub> (light green), LLA (dark green), CIN, CIN<sub>C6V</sub> and CIN<sub>N3S</sub> (orange), SLY (violet), NLV (dark blue), GIL (light blue) and VLH (yellow). Standard deviations are indicated for each frequency data set (n=10 donors).

es
q
ta
tal
ent
Ĕ
le
Ω
2
n

~i
$\square$
1
<b>A</b>
5
F
-
th
.2
2
×
<u>e</u>
2
Ξ
ō
$\mathbf{c}$
Ц
5
E
· 🖂
a
Þ
5
5
F
4
Ľ
Ч
S
્ય
÷
·H
g
st
÷
8
В
8
B
Ŀ
Ð
1
P
ъ
2
<u></u>
Ē
ୂତ୍
E-
0
ర
g
at
Ö
J
٠Ē
a
Ы
õ
Π
ta
N
Ľ
Ū
3
2
(h)
Ĕ
ð
<u>_</u>

			HCMV pp65405.54	nt (NLV) variants		EBV bmlf1 <sub>281,288</sub>	(GLC) & variants	AFP137-145
		NLV <sub>M5A</sub> -A2	NLV <sub>A7H</sub> -A2	NLV <sub>v6C</sub> -A2	NLV <sub>V6G</sub> -A2	GLC-A2	GLC <sub>T4P</sub> -A2	PLF-A2
PDB entry code		3MR9	3MRB	3MRC	3MRD	3MRE	3MRF	3MRK
Data collection statistics								
Space group		$P2_1$	$P2_1$	$P_{2_1}$	$P_{2_1}$	$P\!$	$P_{2_1}$	$P\!2_1$
Cell dimension	a (Å)	54.02	53.36	51,29	53.14	51.55	51.62	51.52
1	b (Å)	81.10	81.09	79.61	80.92	79.43	79.39	79.89
,	c (Å)	57.34	56.79	55.08	56.20	55.58	55.66	55.43
_	β(°)	113.90	112.93	111.83	112.41	112.294	112.023	111.851
Resolution $(Å)^a$		50-1.93 (2.00-1.93)	50-1.40 (1.45-1.40)	20-1.80 (1.90-1.80)	20-1.70 (1.80-1.70)	50-1.10 (1.13-1.10)	50-2.30 (2.38-2.30)	50-1.40 (1.50-1.40)
$\mathbf{R}_{\mathrm{merge}}$ (%) $^{\mathrm{a,b}}$		6.3 (27.9)	6.6(32.0)	6.6(38.6)	8.9 (37.2)	9.0 (39.9)	11.0(40.1)	5.5 (38.3)
Completeness (%) <sup>a</sup>		98.2 (90.1)	96.5 (95.1)	99.6 (99.7)	97.4 (98.7)	90.0 (80.3)	99.3 (97.6)	84.3 (88.9)
I/σ <sup>a</sup>		13.8 (3.1)	13.1 (3.2)	14.4(3.5)	12.4 (5.5)	9.9 (2.15)	11.8(3.62)	9.58 (2.26)
No. Reflexions <sup>a</sup>		116846 (6211)	355691 (21752)	141463 (21205)	188228 (30774)	561749 (22645)	69329 (6519)	156925 (29220)
No. Unique <sup>a</sup>		33491 (3085)	84555 (8317)	38039 (5698)	47219 (7487)	150866 (10414)	18522 (1763)	69080 (13589)
<b>Refinement Statistics</b>								
Protein atoms		3165	3288	3259	3256	3686	3219	3348
Water		296	387	201	232	686	153	300
Resolution (Å)		15-1.93	15-1.40	15-1.80	15-1.70	15-1.10	15-2.30	15-1.40
$\mathbf{R}_{\mathrm{factor}}$ (%) <sup>c</sup>		20.8	21.4	17.9	19.6	18.1	18.9	20.0
R <sub>work</sub> (%) <sup>c</sup>		20.9	21.2	17.8	19.4	18.1	18.6	20.0
$\mathbf{R}_{\mathrm{free}}$ (%) <sup>c</sup>		26.6	24.4	22.3	22.6	20.4	25.8	23.2
Rms deviations from ideality								
Bond lengths (Å)		0.010	0.010	0.011	0.011	0.008	0.009	0.009
Bond angles (°)		1.174	1.295	1.250	1.389	1.242	1.142	1.247

			HCV	NS31073-1081 (CIN) & va	riants		HCV NS3 <sub>1406-1415</sub>	HCV NS4b <sub>1807-1816</sub>
		CIN-A2	CIN <sub>N3S</sub> -A2	CIN <sub>G4M-V5W</sub> -A2	CIN <sub>VSM</sub> -A2	CIN <sub>c6v</sub> -A2	KLV-A2	LLF-A2
PDB entry code		3MRG	3MRH	3MRI	3MRJ	3MRL	3MRM	3MRN
Data collection statistics								
Space group	1	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P_{2_1}$	$P_{2_1}$	$P2_1$	3
Cell dimension a (	: (¥)	53.12	52.98	52.41	54.58	53.63	53.22	97.94
p	(¥)	80.87	80.06	80.51	80.10	80.97	80.99	37.94
c (	;; (¥)	56.20	57.06	55.90	57.88	57.02	56.34	119.86
β	•	112.33	113.717	112.44	114.955	113.174	112.24	90.893
Resolution $( {A})^a$	. 1	20-1.30 (1.40-1.30)	50-2.40 (2.48-2.40)	50-2.10 (2.17-2.10)	20-1.87 (1.94-1.87)	50-2.40 (2.48-2.40)	25-1.90 (1.97-1.90)	25-2.30 (2.38-2.30)
$R_{merge}$ (%) <sup>a,b</sup>		12.5 (31.3)	9.4 (52.8)	10.7 (46.0)	4.1 (24.2)	13.3 (55.3)	10.2 (33.0)	12.3 (36.8)
Completeness (%) <sup>a</sup>		97.2 (87.3)	99.3 (99.1)	99.5 (99.9)	98.0 (85.2)	93.9 (90.2)	93.8 (85.1)	87.3 (63.7)
I/σ <sup>a</sup>		10.2 (2.8)	10.3(3.1)	8.71 (2.8)	20.3 (3.7)	7.8 (2.9)	11.2 (2.9)	7.54 (2.76)
No. Reflexions <sup>a</sup>	1	475518 (37869)	68036 (6120)	93373 (8844)	129916 (6180)	49672 (3798)	134966 (7395)	66736 (4270)
No. Unique <sup>a</sup>		104890(18701)	17070 (1574)	25056 (2331)	36724 (3344)	16618 (1495)	32805 (3039)	17510 (1242)
Refinement Statistics								
Protein atoms	. 1	3440	3167	3169	3253	3151	3356	3180
Water	.,	575	10	28	199	47	273	98
Resolution (Å)		15-1.30	15-2.40	15-2.10	15-1.87	15-2.40	15-1.90	15-1.80
$\mathbf{R}_{\text{factor}}$ (%) <sup>c</sup>		18.0	21.7	23.9	19.0	20.5	19.2	22.2
$\mathbf{R}_{\text{work}}$ (%) <sup>c</sup>		17.9	22.2	23.9	18.8	20.0	19.6	21.4
$R_{free}$ (%) <sup>6</sup>	- 1	20.2	30.8	29.6	23.0	27.9	25.0	29.7
Rms deviations from ideality								
Bond lengths (Å)	-	0.009	0.012	0.011	0.010	0.011	0.009	0.009
Bond angles (°)		1.231	1.401	1.305	1.225	1.223	1.143	1.172

		Melai	na MART1 <sub>26-35</sub> (ELA) vi	ariants	Prostaglandin Trp.
		ELA <sub>ISW</sub> -A2	ELA <sub>ISL-18N</sub> -A2	ELA <sub>ISL-L8N</sub> -A2	LLA-A2
PDB entry code		3MRO	3MRP	3MRQ	3MRR
Data collection statistics					
Space group		$P2_1$	$P2_1$	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$P2_1$
Cell dimension	a (Å)	53.88	53.47	60.87	53.89
ŀ	5 (Å)	81.08	80.95	80.04	81.04
5	c(Å)	57.28	56.96	110.57	57.51
j	3(°)	113.80	113.149	90.06	114.663
Resolution $(Å)^a$		50-2.35 (2.43-2.35)	50-2.10 (2.17-2.10)	50-2.20 (2.28-2.20)	50-1.60 (1.70-1.60)
$\mathbf{R}_{ ext{merge}}$ (%) $^{\mathrm{a,b}}$		11.0 (35.5)	6.8 (23.6)	12.9 (44.9)	3.2 (40.8)
Completeness (%) <sup>a</sup>		98.8 (97.3)	99.1 (94.1)	100.0(100.0)	93.7 (71.3)
I/σ <sup>a</sup>		9.0(3.8)	13.7 (4.7)	12.2 (4.5)	21.8 (2.1)
No. Reflexions <sup>a</sup>		66122 (6221)	94756 (6747)	200625 (20483)	190559 (13292)
No. Unique <sup>a</sup>		18709 (1752)	25947 (2280)	28175 (2818)	55551 (6972)
Refinement Statistics					
<b>Protein atoms</b>		3160	3199	3159	3226
Water		31	131	117	242
Resolution (Å)		15-2.35	15-1.40	15-2.20	15-1.60
$\mathbf{R}_{\mathrm{factor}}$ (%) <sup>c</sup>		22.4	18.7	19.3	19.4
$\mathbf{R}_{\mathrm{work}}$ (%) <sup>c</sup>		21.9	18.4	19.2	19.2
$\mathbf{R}_{\mathrm{free}}$ (%) <sup>6</sup>		27.9	22.7	23.5	22.4
Rms deviations from ideality					
Bond lengths (Å)		0.011	0.010	0.010	0.009
Bond angles (°)		1.265	1.140	1.219	1.196
a. Values in parentheses refer to the	highest	resolution shell			

. Values in parentheses refer to the highest resolution s

$$\begin{split} \text{b. } R_{\text{merge}} &= \sum |I(h,i)-I(h)|/\sum I(h,i) \\ \text{c. } R &= \sum |F_{\text{obs}}(h,i)-F_{\text{obs}}(h,i)|/\sum F_{\text{obs}}(h,i). \\ R_{\text{factor}} \text{ is calculated on all reflection}, \\ R_{\text{free}} \text{ on free set reflections} (10\% \text{ of all reflections}). \end{split}$$

**Table S2**: Peptide thermal motion and electron density level. The relative B-factor is calculated as :  $100 \times (\langle B \rangle_{peptide} - \langle B \rangle_{HLA-A2 \alpha 1 \alpha 2}) / \langle B \rangle_{HLA-A2 \alpha 1 \alpha 2}$ . The density level is the height of the closest electron density peak in sigma unit, calculated on an omit {F<sub>obs</sub>-F<sub>calc</sub>} difference fourier map, in which either the main chain or the side chain atoms of the given peptide position were taken out from the model. \* indicates variants for which a conformational change was observed, in comparison to the wild type peptide.

$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Position		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$ \begin{split} \mathbf{NLV}_{wc}\mathbf{A2} & = \mathbf{B}_{n} \min(\sinh(n)) & 0.06 & -13.0 & -0.15 & 23.0 & 23.4 & 13.3 & 1.25 & 13.8 \\ = \mathbf{B}_{n} \min(\sinh(n)) & 13.3 & 115.2 & 10.1 & 13.28 & 60.4 & 75.6 & -2.7 & 19.19 & -18.60 \\ = \mathbf{A}_{n} \min(h) & 11.2 & 10.24 & 10.4 & 10.4 & 10.4 \\ = accessibe urface (Å) & 12.0 & 0.04 & 41.0 & 73.8 & 164.0 & 18.7 & 30.10 & 45.10 & 30.0 \\ = accessibe urface (Å) & 13.5 & -16.18 & -7.43 & 8.68 & 2.24 & 2.640 & 31.6 & 10.9 & -10.57 \\ = \mathbf{B}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 13.5 & -16.18 & -7.43 & 8.68 & 2.24 & 2.640 & 31.6 & 10.9 & -2.23 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 13.5 & -16.18 & -7.43 & 8.68 & 2.24 & 2.640 & 31.6 & 10.9 & -2.23 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 0.48 & 4.10 & 7.10 & 7.62 & -4.54 & 0.90 & -15.75 \\ = \mathbf{B}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 0.48 & 5.9 & 0.10 & 2.08 & 32.0 & 32.0 & -2.0 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 0.48 & 5.9 & 0.10 & 2.08 & 32.0 & 32.0 & -2.0 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 1.43 & 5.95 & 12.29 & 5.607 & 4.36 & 4.52 & 5.49 & 4.54 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 4.53 & 5.95 & 12.39 & 5.607 & 4.36 & 4.52 & -3.49 & -2.0 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 4.53 & 5.95 & 12.39 & 5.607 & 4.36 & 4.52 & -3.49 & -2.10 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 4.53 & 5.95 & 12.39 & 5.607 & 4.36 & 4.52 & -3.49 & -2.10 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 6.00 & 0.40 & 8.50 & 8.50 & 20.0 & 3.20 & 3.20 & -2.0 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 0.50 & -1.57 & 15.25 & -1.58 & 1.103 & 1.162 & 11.69 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 1.127 & 1.427 & 9.48 & 11.49 & 9.05 & 5.02 & 11.41 & 15.8 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.9 & 0.50 & -1.179 & 16.57 & 1.25 & -1.18 & 1.57 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.55 & -1.79 & 16.5 & -1.79 & 16.5 & -1.80 & 1.80 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.55 & -1.79 & 16.5 & -1.79 & 16.5 & -1.80 & -1.80 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.5 & -1.79 & 1.65 & -1.78 & -1.60 & -2.80 & -1.80 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.1 & -1.10 & 9.66 & -1.11 & -1.62 & -1.60 & -2.60 & -1.60 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.1 & -1.66 & -1.83 & -1.80 & -1.81 & -1.61 & -1.60 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.1 & -1.65 & -1.95 & -1.95 & -1.95 & -1.95 & -1.95 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.1 & -1.64 & -1.62 & -1.81 & -1.62 & -1.11 \\ = \mathbf{A}_{n} \sin(chn) & 0.1 & $												
Be, side chain (%)         23.57         -11.2         -10.4         52.7         -11.9         13.00           el. density side chain (%)         11.2         10.44         9.28         7.12         4         6.44         10.1         10.3         10.1           accessiby surface (Å)         11.2         10.24         9.28         7.12         4         6.44         16.70         10.1           Be, side chain (%)         -1.38         -1.2.19         -7.24         7.62         7.17         7.62         4.54         .9.04         1.00           NLV <sub>MSA</sub> A2         Be, side chain (%)         1.35         -16.18         .7.02         1.04         8.03         5.82         1.28         1.21         0.24           el. density side chain (%)         0.45         1.07         1.04         8.00         9.25         6.10         2.30         8.90         3.20           NLV <sub>MMC</sub> A2         Be, main chain (%)         1.48         5.95         1.20         56.07         48.46         45.29         8.40         1.32         1.42         1.25         4.16         4.10         1.16.3         4.10         9.12         1.52         1.41         1.42         1.255         4.16         4.10         1.1	NLV <sub>wt</sub> -A2	B <sub>rel</sub> main chain (%)	0,06	-13,10	-9,15	23,10	21,79	22,44	13,23	-1,25	1,38	
el. density static chain (?)         11.5         16.34         0.28         7.12         4         6.44         9.16         10.3         10.34         0.28         7.12         4         6.44         9.16         10.3         10.41           accessible surface (Å)         20.30         0.40         4.10         7.30         11.64.0         18.70         30.10         45.10         30.0           NLV <sub>MSX-A2</sub> Be, main chain (%)         1.38         1.21.9         7.22         7.62         7.17         7.62         4.54         9.04         1.15.7           el. density min chain (%)         1.38         1.72.1         0.48         9.33         8.82         10.22         10.23         10.21         10.21         10.21         10.21         10.23         3.83         10.21         10.23         3.83         10.21         11.02         4.61         11.02         4.61         10.22         10.22         10.22         10.22         10.22         10.22         10.22         10.22         10.23         10.24         10.46         10.45         10.25         10.25         10.24         10.45         10.25         10.25         10.25         10.25         10.25         10.25         10.25         10.25		B <sub>rel</sub> side chain (%)	23.87	-11.52	-9.16	23.28	60.44	6.76	-3.27	-19.19	-18.60	
els denny side chan (%)         11.2         10.34         928         7.12         14         6.44         916         10.3         10.41           accessible surface (Å)         20,30         6,40         4,10         73,40         164,40         18,70         30,10         45,10         30,00           NLV <sub>MAC</sub> A2         Ru, main chain (%)         -1,38         -12,0         -72,2         7,62         7,17         7,62         4,51         5,00         -22,63           el density state chain (%)         9,35         16,18         7,34         8,88         2,24         24,80         31,61         19,9         -22,63           el density state chain (%)         14,85         59         12,0         56,07         48,46         45,20         34,00         31,20           NLV <sub>ARE</sub> A2         R <sub>u</sub> main chain (%)         14,85         59         12,30         56,07         48,46         45,20         34,00         14,21         12,55           el density main chain (%)         14,85         59         12,30         56,07         48,46         45,20         34,0         13,04         11,25         12,55           el density side chain (%)         14,65         59,32         17,00         16,66		el. density main chain ( $\sigma$ )	13.5	14.88	16.32	11.3	13.49	10.54	12.45	15.7	12.57	
accessible surface (Å <sup>1</sup> )         20.30         0.40         4.10         73.80         164.40         18.76         30.10         45.10         3.00           NLV <sub>MAA</sub> -A2         B <sub>a</sub> main chain (%)         -1.38         -12.19         -7.24         7.62         7.17         7.62         4.54         -9.04         -15.79           R_abde chain (%)         10.72         10.68         6.93         5.88         2.24         2.480         3.16         10.99         -22.03           el dessity side chain (%)         10.40         4.04         8.83         5.94         7.1         6.44         4.91         5.15         7.98         8.34           accessible surface (Å)         18.00         1.00         1.00         2.08         2.20         3.00         2.00           NLV <sub>ATIT</sub> A2         B <sub>a</sub> main chain (%)         14.83         5.95         12.30         56.07         48.36         45.99         8.40         2.30         3.00         1.02           NLV <sub>ATIT</sub> A2         B <sub>a</sub> main chain (%)         14.83         5.95         12.30         1.02         1.02         1.02         1.02         1.03         1.02         1.03         1.02         1.03         1.02         1.03         1.02         1.04		el. density side chain ( $\sigma$ )	11.2	10.34	9.28	7.12	4	6 44	9.16	10.3	10.41	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		accessible surface (Å <sup>2</sup> )	20.30	0.40	4 10	73.80	164 40	18 70	30.10	45.10	3.00	
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $			20,50	0,10	1,10	75,00	101,10	10,70	50,10	15,10	5,00	
H.D. 300 Te         B <sub>3</sub> side chain (5)         13,25         1-1,15         7-24         8,86         2,24         24,20         24,20         14,10         9,20           el derosity man chain (6)         9,45         10,72         10,40         8         9,35         8,82         10,28         12,10         9,51           el derosity de chain (5)         9,48         5,60         10,20         2,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         3,20         8,20         1,25         et         et         et/3,20         6,10         1,22         1,21         1,21         1,25         et/3,20         1,26         1,24         1,25         et/3,20         1,26         1,24         1,25         et/3,20         1,26         1,24         1,24         1,25         et/3,20         1,26         1,25         et/3,21         1,25         et/3,20         1,20         1,24         1,25         et/3,20         1,	NLVM64-A2	B <sub>rel</sub> main chain (%)	-1.38	-12.19	-7.24	7.62	7 17	7.62	-4 54	-9.04	-15 79	
el densiy main chain (c) $9,44$ $10,27$ $10,49$ 8 $2,56$ $8,24$ $10,28$ $10,28$ $12,19$ $9,51$ el densiy side chain (c) $9,44$ $8,35$ $6,91$ $7,1$ $6,54$ $4,91$ $5,15$ $7,28$ $8,34$ accessible surface (Å) $14,81$ $5,95$ $10,22$ $14,62$ $9,849$ $-2,20$ $-5,10$ $R_{a}$ main chain (b) $14,81$ $5,95$ $10,22$ $7,379$ $105,22$ $34,05$ $31,08$ $-11,62$ $-16,96$ el density side chain (c) $7,45$ $11,62$ $9,56$ $11,88$ $8,55$ $10,93$ $41,21$ $12,55$ el density side chain (c) $7,45$ $11,62$ $9,56$ $11,88$ $8,55$ $10,93$ $41,21$ $12,55$ el density side chain (c) $7,45$ $11,62$ $9,56$ $11,88$ $8,55$ $10,93$ $41,21$ $12,55$ $-17,45$ $11,62$ $-16,96$ el density side chain (c) $7,45$ $11,62$ $9,45$ $5,24$ $5,94$ $8,49$ $10,34$ $11,68$ accessible surface (Å) $19,90$ $0,90$ $0,40$ $85,80$ $85,80$ $88,90$ $20,70$ $30,00$ $44,80$ $1,80$ -100 $-100$	THE V MOA THE	B <sub>rel</sub> side chain (%)	13.75	16.18	7.43	8.68	2.24	24.80	3 16	10.00	22.63	
al. dematy side chain (b) $9.44$ $8.5$ $6.91$ $7.1$ $6.54$ $4.91$ $5.15$ $7.98$ $8.74$ accessible surface (Å)       18.00 $1.40$ $4.60$ $94.50$ $6.10$ $7.16$ $8.90$ $3.20$ $7.16$ $8.90$ $3.20$ NLV <sub>A2R</sub> -A2 $B_{amain} chain (b)$ $14.83$ $5.95$ $12.30$ $5.077$ $48.46$ $45.22$ $8.40$ $-2.30$ $-6.10$ $B_{amain} chain (b)$ $12.29$ $13.22$ $14.82$ $5.66$ $11.83$ $8.51$ $10.93$ $11.62$ $-16.96$ al. density main chain (b) $12.99$ $0.90$ $0.40$ $8.50$ $20.70$ $30.30$ $44.84$ $14.69$ $90.75$ $50.32$ $11.03$ $15.02$ NLV <sub>V66</sub> -A2 * $B_{am}$ main chain (b) $12.89$ $13.66$ $11.74$ $7.7$ $8.33$ $11.03$ $15.02$ $11.03$ $15.02$ $11.03$ $15.02$ $11.03$ $15.02$ $11.03$ $11.03$ $11.03$ $11.03$ $11.03$ $11.03$ $11.03$ $11.03$ $11.03$ $11.$		el. density main chain ( $\sigma$ )	0.45	10.72	10.40	0,00	0.25	24,00	10.28	12.10	0.51	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		el, density side chain ( $\sigma$ )	9,43	0.25	6.01	0	6.24	0,02	5 15	7.09	9,51	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		accessible surface $(Å^2)$	9,04	0,55	4.60	04.50	61.00	20.80	3,15	28.00	3 20	
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $			18,00	1,40	4,00	94,30	61,00	20,80	32,30	38,90	3,20	
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	NI V	B <sub>rot</sub> main chain (%)	14.92	5.05	12.20	56.07	10 16	45.20	<u> </u>	2.20	6.10	
Instruction         38,86         -3.90         1.3.92 <th1.2.1< th="">         1.3.92         1.3.9</th1.2.1<>	INL V A7H-AZ	B <sub>rel</sub> side chain (%)	14,85	5,95	12,30	50,07	48,40	45,29	8,49	-2,30	-0,10	
cl. density side chain (%) $7_{45}$ $11/2$ $11/82$ $92/8$ $57/8$ $6.24$ $8.94$ $8.94$ $8.94$ $10/34$ $11.68$ accessible surface (Å) $19.90$ $0.90$ $0.40$ $85.80$ $88.50$ $20.70$ $30.0$ $44.80$ $1.80$ NLV <sub>vid</sub> -A2 * $B_{at}$ main chain (%) $36.52$ $17.99$ $16.65$ $50.78$ $120.05$ $94.08$ $97.6$ $14.61$ $5.76$ el. density main chain (%) $36.52$ $17.99$ $16.65$ $50.78$ $4.62$ $52.4$ $9.33$ $8.88$ accessible surface (Å') $18.90$ $1.10$ $9.60$ $7.46$ $6.78$ $4.62$ $52.4$ $9.33$ $8.88$ accessible surface (Å') $18.90$ $1.10$ $9.60$ $118.70$ $10.36$ $11.61$ $12.87$ $16.60$ $8.57$ $22.4$ $9.33$ $8.88$ accessible surface (Å') $22.646$ $4.51$ $43.23$ $109.04$ $143.88$ $140.01$ $79.36$ <td></td> <td>el density main chain (<math>\sigma</math>)</td> <td>38,96</td> <td>-5,69</td> <td>10,32</td> <td>73,79</td> <td>105,22</td> <td>34,05</td> <td>31,08</td> <td>-11,02</td> <td>-10,90</td> <td></td>		el density main chain ( $\sigma$ )	38,96	-5,69	10,32	73,79	105,22	34,05	31,08	-11,02	-10,90	
circle data y in cumin (b)       1/35       11/2       9/4       5/5       6/24       5/4       5/4       6/24       5/4       6/24       5/4       6/24       10/24       11/26         NLV <sub>V6C</sub> -A2       *       Bat main chain (*)       1-605       -11/24       17/30       8/4.48       114.09       90.75       50.32       11.03       15.02         NLV <sub>V6C</sub> -A2       *       Bat main chain (*)       2.62       -17/29       16.65       50.78       120.05       94.08       49.76       14.61       5.76         el. density side chain (*)       3.62       1.79       16.65       2.624       9.33       8.88         accessible surface (Å)       18.90       1.10       9.66       7.46       9.40       11.20       16.60       2.24       9.33       8.88         NLV <sub>V6G</sub> -A2       *       Bat main chain (*)       51.56       -7.35       2.692       4.513       11.14       30.013       45.13       10.96       1.10       9.66       6.11       6.12       4       8.57       10.97       9.14         et.density main chain (*)       1.70       6.66       8.50       2.960       5.31       13.14       10.01       9.65       6.11       6.12		el density side chain ( $\sigma$ )	12,29	13,/2	14,82	9,56	11,83	8,53	10,93	14,21	12,55	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		accessible surface $(\Delta^2)$	/,45	11,62	9,4	5,75	0,24	5,94	8,49	10,34	11,68	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		accession surface (A)	19,90	0,90	0,40	85,80	88,50	20,70	30,30	44,80	1,80	
NLV VigC+A2         Jean main chain (*)         -0.05         -11./4         11/30         84.48         114.09         90./5         90.52         11.03         15.02           el. density side chain (*)         12,89         13,46         11.39         7,43         7,7         8,33         11.21         13,77         10,8           el. density side chain (*)         94,2         9,31         6,11         7,4         6,78         4,62         5,24         9,33         8,88           accessible surface (Å <sup>3</sup> )         18,90         1,10         9,60         78,40         9,90         112,70         16,60         28,20         1,80           NLV <sub>V6G</sub> -A2 *         B <sub>of</sub> min chain (*)         26,46         4,51         43,23         109,04         143,88         140,01         79,36         36,13         52,91           B <sub>of</sub> side chain (*)         10,74         11,01         9,66         6,11         6,12         4         8,55         10,77         9,14           el. density side chain (*)         12,51         -15,67         -19,27         -19,73         -20,85         -11,28         -5,13         40,95           without TCR:         accessible surface (Å <sup>3</sup> )         22,01         1,00         4,90	NIV A2*	B., main chain (%)	6.05	11.74	17.00	04.40	114.00	00.75	50.22	11.00	15.00	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	INL V V6C-A2 *	B, side chain (%)	-6,05	-11,74	17,30	84,48	114,09	90,75	50,32	11,03	15,02	
$ \begin{array}{c} \text{cl. cataly sime train (c)} & 12,89 & 13,46 & 11,39 & 7,43 & 7,7 & 8,53 & 11,21 & 13,77 & 10,88 \\ \hline \\ \text{accessible surface (Å^3) & 18,90 & 1,10 & 9,60 & 78,40 & 9,90 & 112,70 & 16,60 & 28,20 & 1,80 \\ \hline \\ \text{NLV}_{V6G}\text{-A2} * & B_{ut} main chain (\%) & 26,46 & 4,51 & 43,23 & 109,04 & 143,88 & 140,01 & 79,36 & 36,13 & 52,91 \\ \hline \\ \text{B}_{ut} side chain (\%) & 51,56 & -7,35 & 26,92 & 45,13 & 113,14 & 30,13 & 45,13 & 19,96 \\ \hline \\ \text{el. density side chain (\%) & 51,56 & -7,35 & 26,92 & 45,13 & 113,14 & 30,13 & 45,13 & 19,96 \\ \hline \\ \text{el. density main chain (\%) & 10,74 & 11,01 & 9,65 & 6,11 & 6,12 & 4 & 8,55 & 10,77 & 9,14 \\ \hline \\ \text{el. density side chain (\%) & 20,10 & 1,10 & 6,60 & 85,50 & 29,60 & 53,10 & 22,30 & 29,00 & 2,60 \\ \hline \\ \text{RA14-NLV}_{wt}-A2 & B_{ut} main chain (\%) & -12,51 & -15,67 & -19,27 & -19,73 & -20,85 & -18,15 & -17,25 & -13,86 & -8,90 \\ \hline \\ \text{Ra14-NLV}_{wt}-A2 & B_{ut} main chain (\%) & 0,77 & -13,73 & -13,98 & 12,51 & -8,08 & -11,28 & -9,80 & -5,13 & -0.95 \\ \hline \\ \text{without TCR: accessible surface (Å^3) & 22,96 & -1,66 & 14,87 & 73,18 & 83,62 & 76,66 & 55,77 & 44,46 & 30,54 \\ \hline \\ \text{CIN-A2 } & B_{ut} main chain (\%) & 20,96 & -1,66 & 14,87 & 73,18 & 83,62 & 76,66 & 55,77 & 44,46 & 30,54 \\ \hline \\ \text{CIN-A2 } & B_{ut} main chain (\%) & 21,28 & -1,32 & 13,34 & 55,18 & 46,90 & 60,46 & 26,56 & 8,48 \\ \hline \\ \text{cl. density main chain (\%) & 21,28 & -1,32 & 33,34 & 55,18 & 46,90 & 60,46 & 26,56 & 8,48 \\ \hline \\ \text{CIN-A2 } & B_{ut} main chain (\%) & 21,83 & 11,34 & 13,2 & 5,36 & 18,51 & 8,84 & 9,25 & 12,13 \\ \hline \\ \text{CIN-A2 } & B_{ut} main chain (\%) & 21,83 & 11,34 & 13,2 & 5,36 & 18,51 & 8,84 & 9,25 & 12,13 \\ \hline \\ \text{CIN}_{GMAVSW}-A2 & B_{ut} main chain (\%) & 23,74 & 24,94 & 47,34 & 52,94 & 57,56 & 59,92 & 57,13 & 50,52 & 47,48 \\ \hline \\ \text{CIN}_{GMAVSW}-A2 & B_{ut} main chain (\%) & 23,74 & 24,42 & 4 & 4,52 & 4 & 4,63 & 4 \\ \hline \\ \text{CIN}_{GMAVSW}-A2 & B_{ut} main chain (\%) & 23,74 & 24,42 & -4 & 4,62 & 4 & 4,63 & 4 \\ \hline \\ \text{CIN}_{VSM}-A2 & B_{ut} main chain (\%) & 23,74 & 24,44 & 47,60 & 55,30 & 21,10 & 122,30 & 39,50 & 2,10 \\ \hline \\ \text{CIN}_$		el density main chain $(\sigma)$	36,52	-17,99	16,65	50,78	120,05	94,08	49,76	14,61	-5,76	
c. dashy ac tain (b)       9,42       9,40       9,40       14,20       16,60       28,20       1,80         NLV       B <sub>aff</sub> main chain (%)       51,56       -7,35       26,92       45,13       113,14       30,13       45,13       19,96         el.density side chain (%)       6,71       8,4       6,17       6,9       5,72       5,44       6,87       7,06         accessible surface (Å <sup>1</sup> )       20,10       1,10       6,66       85,50       29,60       5,10       22,30       29,90       2,60         RA14-NLV <sub>wf</sub> -A2       B <sub>aff</sub> main chain (%)       -12,51       -15,67       -19,27       -19,73       -20,85       -18,15       -17,25       -13,86       -8,90         without TCR:       accessible surface (Å <sup>1</sup> )       12,30       1,00       0,30       11,30       3,10       75,0		el density side chain $(\sigma)$	12,89	13,46	11,39	7,43	7,7	8,33	11,21	13,77	10,8	
accessible surface (A)       18,90       1,10       9,60       78,40       9,90       112,70       16,60       28,20       1,80         NLV <sub>V6G</sub> -A2 *       B <sub>al</sub> main chain (%)       26,46       -4,51       43,23       109,04       143,88       140,01       79,36       36,13       52,91         eld density main chain (%)       51,56       -7,35       26,92       45,13       113,14       30,13       45,13       19,96         eld density main chain (%)       6,71       8,4       6,17       6,9       5,72       5,44       6,87       7,06         accessible surface (Å <sup>2</sup> )       20,10       1,10       6,60       85,50       29,60       53,10       22,30       29,90       2,60         RA14-NLV <sub>wr</sub> -A2       B <sub>w</sub> main chain (%)       -12,51       -15,67       -19,27       -19,73       -20,85       -18,15       -17,25       -13,86       -8,90         without TCR:       accessible surface (Å <sup>2</sup> )       24,20       1,00       4,90       84,40       15,90       15,30       39,40       0,20         without TCR:       accessible surface (Å <sup>2</sup> )       12,30       1,00       0,30       11,30       3,10       7,50       4,04       42,21         CIN-A2		ei. density side chain (6)	9,42	9,31	6,11	7,4	6,78	4,62	5,24	9,33	8,88	
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		accessible suitace (A)	18,90	1,10	9,60	78,40	9,90	112,70	16,60	28,20	1,80	
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		D main shain (0/)										
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	NLV <sub>V6G</sub> -A2 *	$B_{rel}$ main chain (%)	26,46	-4,51	43,23	109,04	143,88	140,01	79,36	36,13	52,91	
el. density side chain (c)       10,74       11,01       9,65       6,11       6,12       4       8,55       10,77       9,14         accessible surface ( $\lambda^2$ )       20,10       1,10       6,60       85,50       29,60       53,10       22,30       29,90       2,60         RA14-NLV <sub>wt</sub> -A2       B <sub>st</sub> main chain (%)       -12,51       -15,67       -19,27       -19,73       -20,85       -18,15       -17,25       -13,86       -8,90         B <sub>st</sub> side chain (%)       0,77       -13,73       -13,98       -12,51       -8,08       -11,28       -9,80       -5,13       -0.95         without TCR:       accessible surface ( $\lambda^3$ )       12,30       1,00       0,30       11,30       3,10       7,50       4,20       0,00       0,20         With TCR:       accessible surface ( $\lambda^3$ )       12,30       1,00       0,30       11,30       3,10       7,50       4,20       0,00       0,20         CIN-A2       B <sub>set</sub> main chain (%)       20,96       -1,66       14,87       73,18       83,62       76,66       55,77       44,46       30,54         el. density side chain (%)       21,28       -1,32       33,34       55,36       18,51       8,48       9,25       12,		$B_{rel}$ side chain (%)	51,56	-7,35	26,92	45,13	113,14		30,13	45,13	19,96	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		el. density main chain (6)	10,74	11,01	9,65	6,11	6,12	4	8,55	10,77	9,14	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		el density side chain ( $\sigma$ )	6,71	8,4	6,17	6,9	5,72		5,44	6,87	7,06	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		accessible surface (A)	20,10	1,10	6,60	85,50	29,60	53,10	22,30	29,90	2,60	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		D 1 1 (0()										
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	RA14-NLV <sub>wt</sub> -A2	$B_{rel}$ main chain (%)	-12,51	-15,67	-19,27	-19,73	-20,85	-18,15	-17,25	-13,86	-8,90	
without TCR:accessible surface $(A^2)$ 24,201,004,9084,40159,0015,3039,4039,400,20with TCR:accessible surface $(A^2)$ 12,301,000,3011,303,107,504,200,000,20CIN-A2Breat main chain (%)20,96-1,6614,8773,1883,6276,6655,7744,4630,54Bed side chain (%)21,28-1,3233,3455,1846,9060,4626,568,48el. density main chain ( $\sigma$ )16,8619,3716,7411,1910,7111,4112,7314,6414,21accessible surface $(A^2)$ 13,302,504,1043,5070,1017,2055,0045,300,50CIN <sub>N3S</sub> -A2Breat main chain ( $\phi$ )48,8746,1847,3452,9457,5659,9257,1350,5247,48el. density main chain ( $\phi$ )46,075,2845,3655,736,125,68el. density main chain ( $\phi$ )45,684,42444,62440,34el. density main chain ( $\phi$ )45,684,4244,62440,34el. density main chain ( $\phi$ )45,684,42444,62440,34ICIN <sub>N3S</sub> -A2Breat main chain ( $\phi$ )45,684,42444,6244,034el. density main chain ( $\phi$ )4 <t< td=""><td></td><td><math>B_{rel}</math> side chain (%)</td><td>0,77</td><td>-13,73</td><td>-13,98</td><td>-12,51</td><td>-8,08</td><td>-11,28</td><td>-9,80</td><td>-5,13</td><td>-0,95</td><td></td></t<>		$B_{rel}$ side chain (%)	0,77	-13,73	-13,98	-12,51	-8,08	-11,28	-9,80	-5,13	-0,95	
with TCR:accessible surface (A')12,301,000,3011,303,107,504,200,000,20CIN-A2 $B_{tel}$ main chain (%)20,96-1,6614,8773,1883,6276,6655,7744,4630,54Brel side chain (%)21,28-1,3233,3455,1846,9060,4626,568,48el. density main chain ( $\sigma$ )12,8311,3413,253,6818,518,849,2512,13accessible surface (Å <sup>2</sup> )13,302,504,1043,5070,1017,2055,0045,300,50CIN <sub>N3S</sub> -A2 $B_{rel}$ main chain (%)48,8746,1847,3452,9457,5659,9257,1350,5247,48CIN <sub>N3S</sub> -A2 $B_{rel}$ main chain ( $\sigma$ )46,075,284446,2444,6244,034CIN <sub>N3S</sub> -A2 $B_{rel}$ main chain ( $\sigma$ )45,684,4244555,736,125,68el. density main chain ( $\sigma$ )45,684,42444,6244,034Bred side chain ( $\sigma$ )45,6637,8942,2332,2718,4012,2912,29CIN <sub>G4M-V5W</sub> -A2* $B_{rel}$ main chain ( $\sigma$ )45,766,1365,247,017,447,54CIN <sub>G4M-V5W</sub> -A2* $B_{rel}$ main chain ( $\sigma$ )7,125,424,576,486,866,096,974,855,65 <tr< td=""><td>without TCR:</td><td>accessible surface (A<sup>2</sup>)</td><td>24,20</td><td>1,00</td><td>4,90</td><td>84,40</td><td>159,00</td><td>15,30</td><td>39,40</td><td>39,40</td><td>0,20</td><td></td></tr<>	without TCR:	accessible surface (A <sup>2</sup> )	24,20	1,00	4,90	84,40	159,00	15,30	39,40	39,40	0,20	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	with TCR:	accessible surface (A <sup>-</sup> )	12,30	1,00	0,30	11,30	3,10	7,50	4,20	0,00	0,20	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$												
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	CIN-A2	B <sub>rel</sub> main chain (%)	20,96	-1,66	14,87	73,18	83,62	76,66	55,77	44,46	30,54	
el. density main chain (c)16,8619,3716,7411,1910,7111,4112,7314,6414,21el. density side chain (c)21,8311,3413,25,3618,518,849,2512,13accessible surface (Å <sup>2</sup> )13,302,504,1043,5070,1017,2055,0045,300,50CIN <sub>N3S</sub> -A2Brel main chain (%)48,8746,1847,3452,9457,5659,9257,1350,5247,48Brel side chain (%)62,3451,9554,3366,3771,7780,8258,7755,68el. density main chain (c)46,075,2845,3655,736,125,6el. density main chain (c)45,684,4244,6244,034accessible surface (Å <sup>2</sup> )1,902,004,6074,6055,3021,10122,3039,502,10CIN <sub>G4M-V5W</sub> -A2 *Brel main chain (c)23,7420,4423,1924,8425,3920,9910,826,696,69el. density main chain (c)7,435,76,56,1365,247,017,447,54el. density main chain (c)7,435,76,556,486,696,974,855,65el. density main chain (c)7,125,424,576,486,606,974,855,65el. density side chain (c)7,125,524,7,069,994116,46106,96 <t< td=""><td></td><td>B<sub>rel</sub> side chain (%)</td><td>21,28</td><td>-1,32</td><td>33,34</td><td></td><td>55,18</td><td>46,90</td><td>60,46</td><td>26,56</td><td>8,48</td><td></td></t<>		B <sub>rel</sub> side chain (%)	21,28	-1,32	33,34		55,18	46,90	60,46	26,56	8,48	
ef. density side chain ( $\sigma$ )21,8311,3413,25,3618,518,849,2512,13accessible surface (Å <sup>2</sup> )13,302,504,1043,5070,1017,2055,0045,300,50CIN <sub>N3S</sub> -A2B <sub>rel</sub> main chain (%)48,8746,1847,3452,9457,5659,9257,1350,5247,48B <sub>rel</sub> side chain (%)62,3451,9554,3366,3771,7780,8258,7755,68el. density main chain ( $\sigma$ )46,075,2845,3655,736,125,6el. density side chain ( $\sigma$ )45,684,4244,6244,034accessible surface (Å <sup>2</sup> )1,902,004,6074,6055,3021,10122,3039,502,10CIN <sub>G4M-V5W</sub> -A2 *B <sub>rel</sub> main chain (%)23,7420,4423,1924,8425,3920,9910,826,696,69B <sub>rel</sub> side chain ( $\sigma$ )7,435,76,56,1365,247,017,447,54el. density main chain ( $\sigma$ )7,125,424,576,486,866,096,974,855,65el. density side chain ( $\sigma$ )7,125,544,576,486,866,096,974,855,65el. density main chain ( $\sigma$ )7,125,544,576,486,866,096,974,855,65el. density side chain ( $\sigma$ )7,125,7547,0699,94 <td></td> <td>ei. density main chain (<math>\sigma</math>)</td> <td>16,86</td> <td>19,37</td> <td>16,74</td> <td>11,19</td> <td>10,71</td> <td>11,41</td> <td>12,73</td> <td>14,64</td> <td>14,21</td> <td></td>		ei. density main chain ( $\sigma$ )	16,86	19,37	16,74	11,19	10,71	11,41	12,73	14,64	14,21	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		el. density side chain ( $\sigma$ )	21,83	11,34	13,2		5,36	18,51	8,84	9,25	12,13	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		accessible surface (A <sup>2</sup> )	13,30	2,50	4,10	43,50	70,10	17,20	55,00	45,30	0,50	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		D 11.00										
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	CIN <sub>N3S</sub> -A2	B <sub>rel</sub> main chain (%)	48,87	46,18	47,34	52,94	57,56	59,92	57,13	50,52	47,48	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		B <sub>rel</sub> side chain (%)	62,34	51,95	54,33		66,37	71,77	80,82	58,77	55,68	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		el. density main chain ( $\sigma$ )	4	6,07	5,28	4	5,36	5	5,73	6,12	5,6	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		el. density side chain ( $\sigma$ )	4	5,68	4,42		4	4,62	4	4,03	4	
$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		accessible surface (A <sup>2</sup> )	1,90	2,00	4,60	74,60	55,30	21,10	122,30	39,50	2,10	
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$												
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	CIN <sub>G4M-V5W</sub> -A2 *	B <sub>rel</sub> main chain (%)	23,74	20,44	23,19	24,84	25,39	20,99	10,82	6,69	6,69	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		B <sub>rel</sub> side chain (%)	34,69	25,96	37,89		42,83	35,27	18,40	12,29	12,29	
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		el. density main chain ( $\sigma$ )	7,43	5,7	6,5	6,13	6	5,24	7,01	7,44	7,54	
$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		el. density side chain ( $\sigma$ )	7,12	5,42	4,57	6,48	6,86	6,09	6,97	4,85	5,65	
CIN <sub>V5M</sub> -A2         B <sub>rel</sub> main chain (%)         10,71         5,75         47,06         99,94         116,46         106,96         52,43         12,36         -1,27           B <sub>rel</sub> side chain (%)         30,37         10,76         46,31         122,74         125,60         65,11         12,39         -12,54		accessible surface (Å <sup>2</sup> )	9,80	4,60	12,10	133,70	0,50	78,90	34,30	29,90	2,10	
CIN <sub>V5M</sub> -A2 $B_{ret}$ main chain (%)         10,71         5,75         47,06         99,94         116,46         106,96         52,43         12,36         -1,27 $B_{ret}$ side chain (%)         30,37         10,76         46,31         122,74         125,60         65,11         12,39         -12,54												
$B_{rel}$ side chain (%)30,3710,7646,31122,74125,6065,1112,39-12,54	CIN <sub>V5M</sub> -A2	B <sub>rel</sub> main chain (%)	10,71	5,75	47,06	99,94	116,46	106,96	52,43	12,36	-1,27	
		B <sub>rel</sub> side chain (%)	30,37	10,76	46,31		122,74	125,60	65,11	12,39	-12,54	

	el. density main chain ( $\sigma$ )	12.51	12.13	9.87	6.25	6.12	6.39	10.17	12	11.1	
	el. density side chain ( $\sigma$ )	13.64	7.28	8.83	0,20	4	6.29	6.93	7.84	8 4 8	
	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	16.20	2 00	4 20	43.60	133 30	47.30	44 10	43.40	3.00	
		10,20	2,00	1,20	15,00	155,50	17,50	11,10	15,10	5,00	
CIN <sub>COV</sub> -A2	Brel main chain (%)	53 48	49.73	62.66	81.38	94.65	96.69	84 44	65 39	60.62	
0	B <sub>rel</sub> side chain (%)	68 19	50.23	59.21	01,50	96.16	101 34	105.83	68 53	59.90	
	el. density main chain ( $\sigma$ )	6.14	6 55	54	4	4	4	4 79	6 54	56	
	el. density side chain ( $\sigma$ )	5.12	5 56	4 74		4	4	5.87	4	4 52	
	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	9 30	2 90	3 70	39.60	85.40	3630	107.00	40.00	1.50	
		9,50	2,90	5,70	39,00	85,40	50,50	107,00	40,00	1,50	
FLA-A2	B <sub>rel</sub> main chain (%)	2.80	21.51	11.12	16.05	8 62	0.15	18 51	7.50	28.26	12.27
LLITIZ	B <sub>el</sub> side chain (%)	-2,80	12.69	22.91	0.00	19.64	9,15	0.40	10.40	12.11	20.05
	accessible surface $(Å^2)$	42,69	-15,08	-52,61	62.80	70.00	0.00	-0,49	64.90	40.10	-20,03
		42,40	0,40	2,10	02,80	79,00	0,90	24,10	04,80	40,10	3,30
FL A	Brat main chain (%)	5 56	1.96	5.56	25.00	25.60	21.52	10.75	12.50	1.20	0.60
LL/15W-/12	B <sub>-1</sub> side chain (%)	3,30	-4,80	3,30	23,00	23,09	21,33	18,75	12,50	1,39	-0,09
	el density main chain ( $\sigma$ )	23,83	-13,07	8,20	0,00	59,92	(1)	13,22	33,03	4,02	-5,89
	el density side chain ( $\sigma$ )	6,98	8,80	1,15	5,49	6,06	0,10	1,22	/,1	9,05	6,98
	accessible surface $(Å^2)$	5,54	7,92	4,3	40.00	5,39		6,52	4,52	4,72	5,8
		39,80	0,80	1,50	40,50	186,70	4,00	28,30	42,90	36,70	5,20
FLAm A2	Brel main chain (%)	252	0 21	1 1 0	10.26	14.21	2.52	2.22	2.52	7.07	1 10
LLI ISL-L8N*A2	B <sub>rel</sub> side chain (%)	2,33	-0,51	-1,18	19,20	14,31	2,33	1 2 C	2,33	-/,0/	-1,18
	el density main chain (70)	23,63	-7,90	-0,01	7.75	20,3/	0.74	4,30	0,40	12,00	-5,49
	el density side chain (0)	10,36	10,3	9,3	1,15	8,41	9,64	10,04	9,82	11,85	10,27
	accessible surface $(\lambda^2)$	7,65	8,76	7,96	40.07	7,09		6,68	9,45	6,87	7,53
 	accession suitact (A)	43,60	1,80	0,30	48,00	130,10	1,70	18,70	45,90	37,90	0,00
	B, main chain (%)	7.00	5.12	14.50	12.20	0.15	0.00	7.05	2.22	14.51	22.02
MELJ-ELA-AZ	$B_{rel}$ main chain (%)	7,26	-5,13	-14,50	-12,38	-8,15	-9,66	-7,25	3,33	14,51	32,03
:	$D_{rel}$ side enam (76)	19,59	5,17	-24,88		-3,84		-16,46	-9,25	7,88	36,42
without TCR.	accessible surface ( $Å^2$ )	26,30	1,20	5,20	61,30	82,80	1,00	28,50	59,20	40,30	3,00
with TCR.		8,20	0,30	0,00	4,60	0,40	0,20	0,00	21,30	15,10	3,00
	B <sub>-1</sub> main chain (%)	7.02	2.49	10.77	20.42	26.77	27.21	24.40	10.11	( 07	0.20
LLA-A2	B , side chain (%)	-7,02	-3,48	10,77	29,42	30,77	37,31	34,49	19,11	0,97	8,20
	el density main chain ( $\sigma$ )	-0,42	-3,97	7,91	0.00	35,64	5.94	36,50	24,46	/,45	4,91
	el density side chain ( $\sigma$ )	13,22	11,65	11,04	8,99	5,23	5,26	8,39	10,23	11,53	10,25
	accessible surface $(\lambda^2)$	8,33	10,55	8,06		4,96		4,45	5,36	8,1	8,01
		23,70	1,70	1,80	63,60	95,70	3,20	26,90	41,70	43,50	3,80
	B, main chain (%)	2.10	0.40	0.40	20.02	22.00	27.41	20.00	10.42	5.07	2.50
KLV-A2	B <sub>rel</sub> side chain (%)	-3,10	-8,48	0,49	20,83	33,99	27,41	28,00	18,43	5,87	-2,50
	el density main chain ( $\sigma$ )	48,35	-10,20	0,/3	22,10	10.24	0.07	30,14	46,52	20,88	-10,30
	el density side chain ( $\sigma$ )	9,87	0.11	5.21	9,33	10,34	8,00	8,51	9,5	11,50	0.17
	en denský slae enam (6)	0,45	8,11	5,21	3,33	4	4.10	5,79	7,03	4,08	8,17
		60,40	2,50	1,80	/3,10	121,30	4,10	20,80	43,80	42,80	0,40
LIE-A2	B <sub>rel</sub> main chain (%)	22.50	24.74	20.72	21.11	22.05	8.01	1.66	0.26	8.00	11.17
	B <sub>rel</sub> side chain (%)	-14.88	-30.19	-56.01	-15.36	-26.84	-0,91	-1,00	-9,50	-1.50	-18.23
	el. density main chain ( $\sigma$ )	7 89	8 35	8 88	9.11	9.18	5.68	4 79	635	63	7.61
	el. density side chain ( $\sigma$ )	6.5	6.21	8 51	8 73	7.21	7 88	.,/>	0,55	8 36	5 32
	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	26.60	2.30	13 40	65 10	6.70	115 80	34 10	4.60	124 80	1.10
			.,	2,10			,00	,	.,	,	.,
GLC-A2	B <sub>rel</sub> main chain (%)	-21,55	-21,55	-2,24	76,21	90,69	119,66	82,24	41,21	36,38	
	B <sub>rel</sub> side chain (%)		-28,13	-1.05	86,45	80,20	85,41	57.28	33,33	7.29	
	el. density main chain ( $\sigma$ )	24,16	22,64	19,71	14,69	14,34	9,54	12,94	15,81	15,83	
	el. density side chain ( $\sigma$ )	у -	18,65	27,68	8,63	4	4	9,54	18,34	11,21	
	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	0.00	2.70	3.50	104.60	27.40	95.60	6.40	84.00	2.40	
GLC <sub>T4P</sub> -A2*	B <sub>rel</sub> main chain (%)	-5,29	1,20	34,93	68,02	107,59	117,97	82,94	68,02	79,70	
	B <sub>rel</sub> side chain (%)		-1,44	35,12	59,27	125,20	128,46	81,46	95,82	83,42	
	el. density main chain ( $\sigma$ )	7.05	8.53	8,45	5,75	6.4	5,66	9,46	8,36	6,74	
	el. density side chain ( $\sigma$ )	,	6.97	9.96	6,52	4	4	5,93	8,47	4.89	
	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	0,00	2,80	1,40	101,30	61,60	12,90	19,50	103,10	6,50	
		,	,	, •	. ,• •	,	,. ♥	- ,- *		,. ¥	
PLF-A2	Brel main chain (%)	6,09	-4,22	11,25	80,51	98,19	70,19	22,30	4,62	9,78	
	B <sub>rel</sub> side chain (%)	10,19	-11,31	16,90	90,14	88,12	63,26	48,48	8,84	1,45	
	el. density main chain ( $\sigma$ )	13	13.5	11,49	9,27	7,08	8,59	15.76	13,17	12,15	
	el. density side chain ( $\sigma$ )	6.73	9.53	7.53	4	4	9.35	8.2	9.37	8.64	
	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	5.00	2.10	11.60	129.20	68.40	14.90	55.60	31.30	0.60	
		,	, ÷	,,,*	.,=*	-,	,. ♥	- ,/*	,- «	,	

GIL-A2	Brel main chain (%)	10.15	8 30	11.07	20.29	24.89	37 34	32.73	40.10	41 49	
	B <sub>rel</sub> side chain (%)	10,10	-3,94	-7,81	20,27	31,29	43,84	25,02	47,22	31,78	
	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	0,00	5,50	2,10	70,80	49,20	58,30	20,40	38,40	5,40	
JM22-GIL-A2	Brel main chain (%)	-16,53	-28,52	-28,94	-29,37	-33,22	-29,80	-25,52	-19,96	-2,83	
	B <sub>rel</sub> side chain (%)		-31,79	-24,96		-29,38	-28,98	-29,38	-26,17	8,74	
without TCR:	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	0,00	3,70	1,00	68,40	49,50	57,30	24,50	47,60	2,70	
with TCR:	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	0,00	3,70	1,00	8,30	6,40	2,10	4,10	6,20	2,70	
SLY-A2	Brel main chain (%)	53,48	49,73	62,66	81,38	94,65	96,69	84,44	65,39	60,62	
	Brel side chain (%)	68,19	50,23	59,21	68,19	96,16	101,34	105,83	68,53	59,90	
	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	7,40	2,80	24,00	93,90	80,20	23,90	29,80	54,90	1,80	
VLH-A2	B <sub>rel</sub> main chain (%)	-27,18	-17,01	11,37	39,75	55,81	51,53	22,08	9,23	14,05	
	B <sub>rel</sub> side chain (%)										
	accessible surface (Å <sup>2</sup> )	10,20	2,40	5,40	117,70	90,00	14,00	63,90	79,10	3,50	

# DISCUSSION

#### I. DÉTERMINANTS DE L'ANTIGÉNICITÉ DES COMPLEXES PCMH DE CLASSE I

Le répertoire de TCR est généré de manière aléatoire à partir de segments géniques variables, avant d'être remodelé dans le thymus par les sélections positive et négative pour produire un set de TCR reconnaissant des peptides antigéniques présentés par des CMH du soi (Starr et al., 2003). L'élucidation du rôle des sélections thymiques dans ce processus a déjà fait l'objet de nombreuses recherches, mais certaines questions restent débattues : dans quelle mesure la capacité des TCR à réagir vis-à-vis de peptides présentés par des CMH estelle inscrite dans les segments germinaux des TCR, ou dépendante des sélections intrathymiques ? Quelle est l'importance de la peptide-spécificité d'un TCR pour sa sélection positive ? Quelles sont les caractéristiques du répertoire T éliminé par sélection négative ? Les données obtenues au cours de ce travail de thèse offrent un aperçu de réponses. Elles ont déjà été discutées en détail, mais de façon thématique, dans la partie Résultats. Nous allons proposer ici une discussion transversale, tentant d'intégrer et d'unifier les données obtenues dans les différents projets.

# A. Les complexes pCMH I sont inégalement antigéniques dans le répertoire T CD8<sup>+</sup> naïf

Le développement d'une nouvelle stratégie d'enrichissement immunomagnétique des cellules T marquées par des multimères de complexes pCMH fluorescents a représenté une importante avancée technologique pour l'étude des populations T rares chez la souris (Moon et al., 2007). Cette technologie nous a permis d'énumérer *ex vivo* les précurseurs T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'épitopes viraux et tumoraux A2-restreints et présents dans le sang périphérique de donneurs A2<sup>+</sup> sains et « naïfs » pour les Ag étudiés. Indépendamment de nos travaux, l'équipe de Matthew Albert a également adapté cette stratégie au modèle humain dans un article publié quelques mois avant la publication de notre étude dans le Journal of *Immunology*, et rapportant la fréquence des précurseurs T CD8<sup>+</sup> dirigés contre 6 épitopes A2restreints, et notamment MelA, Gag et pp65 (Alanio et al., 2010). L'étude de Alanio et collègues, résolument orientée vers le potentiel clinique de la détection de cellules rares Agspécifiques, a élégamment montré la pertinence fonctionnelle du marquage tétramère en documentant la maturation spécifique des cellules MelA/A2<sup>+</sup> en présence de DC pulsées avec MelA (Alanio et al., 2010), expérience que nous pensons faire défaut à la notre propre étude (voir Limitations de l'étude). Il est également à noter que les fréquences de précurseurs (indépendamment de leur phénotype naïf ou mémoire) mesurées dans les deux études, bien

que très similaires pour MelA/A2 (médiane de  $1,3.10^{-4}$  contre  $2,5.10^{-4}$  dans nos mains) et Gag/A2 ( $1,9.10^{-6}$  contre  $2,6.10^{-6}$ ), varient de plus d'un log pour les précurseurs anti-pp65/A2 ( $0,6.10^{-6}$  contre  $8,5.10^{-6}$ ) (Alanio et al., 2010). Cette différence sélective, qui peut être liée à de multiples facteurs compte tenu de l'usage de multimères de valences différentes, à des concentrations finales différentes, pour des tris sur des colonnes aimantées de tailles différentes, nous semble délicate à interpréter. Surtout, et de façon intéressante, cette étude indépendante a abouti à deux observations tout à fait similaires aux notres : la taille des populations CD8<sup>+</sup> pA2-spécifiques varie dramatiquement (jusqu'à 100 fois) selon l'épitope considéré, mais reste remarquablement conservée d'un individu A2<sup>+</sup> à l'autre, indiquant une influence mineure des autres allèles HLA sur la taille du répertoire T pA2-spécifique. Cette antigénicité (définie comme la capacité d'un complexe pCMH à être reconnu par un grand nombre de TCR dans le répertoire T naïf) différentielle des complexes pCMH I peut être due à de nombreux facteurs, et notamment aux processus d'expansion homéostatique périphérique, aux sélections intrathymiques, et à la topologie du complexe pCMH.

# B. REMODELAGE QUANTITATIF ET QUALITATIF DU RÉPERTOIRE T CD8<sup>+</sup>AG-Spécifique par les sélections thymiques

Le répertoire T périphérique est maintenu par l'action combinée des processus homéostatiques et de la production thymique de cellules T nouvelles et appelées RTE (Recent Thymic Emigrants). L'utilisation de souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur RAG a récemment permis de montrer que les RTE sont phénotypiquement et fonctionnellement immatures par rapport aux cellules T matures naïves (Boursalian et al., 2004; Houston et al., 2008). D'autre part, les processus d'expansion homéostatique, de survie ou de sensibilité aux signaux pro-apoptotiques peuvent affecter différentiellement les cellules T naïves (Correia-Neves et al., 2001; Venturi et al., 2008), et sont donc potentiellement à l'origine des disparités de fréquences de cellules T Ag-spécifiques que nous avons observées en périphérie. Toutefois, l'analyse comparative des fréquences de cellules CD8<sup>+</sup> pA2spécifiques dans le thymus et dans le sang périphérique a clairement exclu l'hypothèse d'un remodelage du répertoire T CD8<sup>+</sup> en périphérie. En revanche, une contribution des processus de sélections thymiques aux variations de taille des populations CD8<sup>+</sup> pA2-spécifiques a été démontrée, d'abord de façon indirecte grâce à l'analyse comparative des fréquences de lymphocytes T périphériques A2-restreints chez des individus exprimant ou non le HLA-A2, ensuite de façon directe en mesurant dans le thymus la réactivité du répertoire T avant et après les étapes de sélections. Ce remodelage thymo-dépendant de la réactivité du répertoire T est

sélections. Ce remodelage thymo-dépendant de la réactivité du répertoire T est hétérogène, et varie selon la spécificité antigénique considérée : tandis que les cellules MelA/A2-spécifiques sont enrichies d'un log chez les donneurs A2<sup>+</sup>, les fréquences de cellules pp65/A2-spécifiques ne sont pas affectées par l'haplotype du donneur, ni même par l'expression du corécepteur CD8, suggérant un rôle mineur, voire nul, des processus de sélections thymiques dans le remodelage quantitatif de certaines populations Ag-spécifiques.

D'autre part, une maturation qualitative du répertoire T est attribuable aux sélections thymiques, et potentiellement à la sélection négative, puisque les populations CD8<sup>+</sup> MelA/A2-, PGT/A2- et NS3/A2-spécifiques sélectionnées sur le A2 reconnaissent leur Ag de façon absolument peptide-spécifique *in vitro*, tandis que les cellules sélectionnées sur d'autres allèles de classe I présentent un mode de reconnaissance plus dégénéré. En accord avec des études précédentes chez la souris (Huseby et al., 2003, 2005), ces différences de degré de crossréactivité ne sont pas associées à des différences d'avidité fonctionnelle (ou EC<sub>50</sub>), d'affinité des TCR ou même de mode de docking sur le pCMH, et résident donc probablement dans de fines nuances de positionnement des CDR au contact du sillon peptidique.

Enfin, nos données suggèrent que les processus de choix de lignage CD4/CD8 remanient le répertoire T de façon qualitative, en associant un programme fonctionnel (helper, cytotoxique, ...) à l'expression d'un corécepteur adapté (CD4 ou CD8), mais aussi de façon quantitative, l'expression du CD8 augmentant d'un log les fréquences de cellules T matures dirigées contre MelA/A2, PGT/A2 ou NS3/A2.

# C. L'Antigénicité d'un complexe pCMH est gouvernée par sa topologie globale

Clairement, les sélections thymiques ne sont pas le seul paramètre à l'origine des variations de fréquences des cellules T pA2-spécifiques, puisque même dans le répertoire T non sélectionné, certains Ag (i.e. MeIA/A2) sont jusqu'à dix fois mieux reconnus que d'autres (i.e. Gag/A2 ou pp65/A2). De façon intéressante, cette réactivité préférentielle du répertoire T non sélectionné vis-à-vis de certains complexes pCMH I est retrouvée dans le répertoire T CD8<sup>+</sup> périphérique après sélections sur le A2, mais aussi sur des CMH I non-A2, et également dans le répertoire T CD4<sup>+</sup>, qui a pourtant été sélectionné sur un CMH de classe II. Cette hiérarchie de reconnaissance, conservée dans toutes les sous-populations T, ne semble pas l'être dans le répertoire B, indiquant que si certains Ag sont intrinsèquement mieux reconnus que d'autres par le répertoire T, c'est présumément à cause de paramètres structuraux

favorisant les interactions inhérentes des segments germinaux du TCR avec les hélices  $\alpha$  des CMH.

L'existence de ces interactions TCR-CMH conservées, qui a été proposée pour la première fois il y a 40 ans (Jerne, 1971) et investiguée depuis par de nombreuses équipes travaillant sur des modèles murins (Huseby et al., 2005; Zerrahn et al., 1997; Merkenschlager et al., 1997; Blackman et al., 1986; Marrack et al., 2008; Dai et al., 2008; Scott-Browne et al., 2009; Feng et al., 2007), est démontrée chez l'homme par la forte réactivité du répertoire T fraîchement réarrangé vis-à-vis des complexes pA2. Bien qu'on ne puisse exclure une contribution des mécanismes de réarrangements des segments V(D)J dans l'établissement de cette réactivité intrinsèque des TCR, il semble raisonnable d'imaginer une coévolution des loci du TCR et du CMH à partir d'un couple TCR-CMH primordial. Ces interactions TCR-CMH intrinsèques sont probablement faibles, et peuvent être modulées positivement ou négativement par les chaînes latérales du peptide (Wang et Reinherz, 2002). Dès lors, la forte antigénicité des complexes MelA/A2 ou PGT/A2 pourrait s'expliquer simplement par leur homologie structurale globale avec le putatif ligand de TCR ancestral. Le fait que dans nos mains, aucun paramètre structural particulier ne corrèle avec l'antigénicité du complexe pCMH considéré supporte cette idée, en suggérant que le marqueur moléculaire de l'antigénicité réside dans une topologie d'ensemble, et non dans un caractère générique simple, contrairement au modèle proposé par P. C. Doherty et basé sur le degré de protrudance du peptide (Turner et al., 2006).

# D. Les sélections thymiques ont pour effet d'accentuer les différences d'antigénicités liées aux topologies des complexes pCMH

Nous avons donc défini deux paramètres, les processus de sélections thymiques et la topologie du pCMH, qui gouvernent la taille d'un répertoire T Ag-spécifique. Il semble toutefois qu'il y ait un lien entre ces deux facteurs *a priori* distincts, puisque la réactivité inhérente du répertoire DP est corrélée aux taux d'enrichissements dus aux sélections intrathymiques, et ce même lorsque les sélections sont médiées par des allèles non A2, en accord avec l'idée qu'il existe des homologies structurales au-delà des polymorphismes des hélices  $\alpha$  du CMH de classe I. En d'autres termes, le remodelage intrathymique du répertoire T accentue les différences d'antigénicité des complexes pCMH, qui préexistaient dans le répertoire T non sélectionné. En éliminant du répertoire immature les TCR incapables d'engager le CMH du soi, les sélections thymiques (et probablement la sélection positive et la mort par négligence) enrichissent le répertoire en cellules réactives vis-à-vis du CMH (du soi,

mais aussi du non soi), c'est-à-dire en cellules capables d'exploiter les motifs d'interactions TCR-CMH conservés. De façon passive, le remodelage va ainsi augmenter la réactivité du répertoire T envers les Ag homologues au pCMH ancestral (i.e. MelA/A2 ou PGT/A2). En revanche, un tel remodelage n'améliorera pas l'antigénicité des complexes qui n'exploitent pas les motifs d'interactions inscrits dans les boucles germinales des TCR. Ces Ag (i.e. pp65/A2 ou Gag/A2) devant « réinventer » leur mode d'interaction avec le TCR, présumément en exploitant la flexibilité des CDR3, il n'est pas surprenant qu'ils soient capables d'interagir de façon équivalente avec les cellules des répertoires T non sélectionnés, matures CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>.

# E. Les complexes pCMH peu antigéniques sont immunogènes chez l'homme, et sont reconnus par des TCR crossréactifs

D'après notre modèle, les variations d'antigénicité des pCMH dans le répertoire T non sélectionné, mais aussi dans les répertoires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> matures, sont dictées par la capacité de l'Ag à exploiter les motifs d'interactions TCR-CMH inhérents, c'est-à-dire par sa proximité structurale avec le supposé pCMH ancestral. Ce modèle est supporté par l'observation cristallographique que MeIA/A2 exploite essentiellement les boucles germinales du TCR (et notamment le CDR1 $\alpha$ ) (Cole et al., 2009), tandis que pp65/A2 établit principalement des contacts avec les boucles CDR3 (Voir annexes, (Gras et al., 2009; Reiser et al., 2009)). Le fait que les biais de répertoires soient identiques dans les répertoires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> indique que le pCMH à lui seul, et non les corécepteurs (Housset et al., 1997), gouverne le docking du TCR sur son ligand. Les différences dans les modes d'interaction imposées par le pCMH au TCR ont des conséquences fonctionnelles non négligeables.

En effet, la fréquence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est corrélée au pourcentage de cellules naïves qui composent le répertoire Ag-spécifique chez les donneurs A2<sup>+</sup> « naïfs », c'est-à-dire présumément au degré de crossréactivité des TCR marqués par les multimères de complexes pCMH. Ainsi, les cellules MelA/A2-spécifiques présentent essentiellement un phénotype naïf, indiquant une absence de réactivité vis-à-vis d'Ag environnementaux, tandis que celles dirigées contre Gag/A2 ou pp65/A2 sont le plus souvent mémoires, sans doute à cause d'une stimulation par un autre Ag. Ces différences phénotypiques pourraient s'expliquer par une présence en périphérie d'Ag présentant une topologie plus proche de Gag/A2 ou pp65/A2 que de MelA/A2 ou PGT/A2. Cette hypothèse est défendue par le groupe de P. C. Doherty (Turner et al., 2006), qui postule que les peptides rencontrés en périphérie seraient structuralement différents de ceux exprimés dans le thymus. On voit mal cependant quels

mécanismes seraient à même d'assurer une telle uniformité des peptides présentés par les cTEC, et encore moins des peptides viraux ou tumoraux en périphérie.

Une autre explication peut être proposée dans le cadre du modèle présenté plus haut. On peut imaginer que les Ag (i.e. MelA/A2) proches du putatif ligand de TCR ancestral recrutent un répertoire de TCR présentant des CDR3 peu flexibles, ou suffisamment courts pour permettre les interactions du pCMH avec les CDR1 et 2 du TCR. Un tel répertoire serait large, mais constitué de cellules incapables d'engager de nombreux ligands différents. À l'inverse, des Ag comme pp65/A2 ou Gag/A2 seraient contraints d'interagir principalement avec les CDR3 du TCR, et pourraient recruter un répertoire exprimant des CDR3 longs et flexibles. De telles cellules T seraient peu nombreuses à interagir avec un Ag donné, mais chacune serait capable de stabiliser une interaction avec de nombreux pCMH différents. Ces hypothèses sont appuyées par le fait que la majorité des TCR anti-MelA/A2 ont une affinité médiocre pour leur ligand (Gervois et al., 1996; Trautmann et al., 2002), contrairement aux TCR anti-pp65/A2 par exemple (Trautmann et al., 2005). Selon nous, cette faible affinité illustre le fait que l'énergie de liaison conférée par les seules boucles germinales du TCR est probablement faible et diffuse, en accord avec l'idée d'une restriction au CMH gouvernée de façon « lâche », sans point de contact partagé identifié dans les analyses cristallographiques des complexes TCR-pCMH (Housset et Malissen, 2003).

Deux modes de reconnaissance distincts, imposés par l'Ag lui-même, sont ainsi dessinés par notre modèle : d'un côté, les Ag exploitant la restriction germinale au CMH des TCR recruteraient un répertoire large, amplifié par les sélections thymiques, mais peu crossréactif et présentant une faible affinité pour l'Ag. À l'autre extrême, les Ag imposant une reconnaissance somatique recruteraient une population peu fréquente, mais très crossréactive et de forte affinité. Ces différents modes d'interaction pourraient ainsi expliquer l'apparent paradoxe que chez l'homme, l'antigénicité d'un complexe pCMH est inversement proportionnelle à son immunogénicité : les populations très fréquentes telles que celles dirigées contre MelA/A2 produisent des réponses immunitaires moins performantes que les populations anti-pp65/A2 (Altman et al., 1996; Trautmann et al., 2005), qui sont pourtant très peu représentées avant infection.

#### **II.** LIMITATIONS DE L'ÉTUDE

#### A. Limites d'une étude quantitative

Nos données sont essentiellement basées sur l'analyse *ex vivo* des fréquences et des propriétés phénotypiques des cellules T marquées par des multimères de complexes pA2. Cependant, nous avons montré que les populations T allogéniques, malgré des caractéristiques d'affinité, de biais de répertoire et de peptide-spécificité identiques *ex vivo* à leurs homologues Ag-spécifiques, présentaient *in vitro* un mode de reconnaissance beaucoup plus peptide-dégénéré. La taille d'une population T Ag-spécifique définie *ex vivo* ne permet donc pas de préjuger de sa qualité, et l'on ne peut exclure par exemple que malgré des fréquences similaires chez les donneurs A2+ et A2-, les populations T pp65/A2-spécifiques soient fonctionnellement très différentes selon leur contexte de maturation. La rareté de ces cellules a jusqu'à présent exclu la possibilité de les « sortir » pour les cultiver *in vitro*. Si notre hypothèse d'un mode de reconnaissance « somatique » imposé par Gag/A2 ou pp65/A2 s'avère juste, il faut s'attendre à trouver beaucoup moins de cellules peptide-indépendantes dans les répertoires T A2<sup>-</sup> dirigés contre ces deux Ag que dans ceux dirigés contre MelA/A2, PGT/A2 et dans une moindre mesure NS3/A2.

#### B. Nécessité d'élargir l'étude à d'autres complexes antigéniques

Nous avons focalisé notre étude à six épitopes A2-restreints immunodominants. Il serait important d'évaluer la réactivité du répertoire T vis-à-vis de peptides aléatoires présentés par le A2. Nos données préliminaires utilisant des variants peptidiques de MelA, NS3 ou pp65 suggèrent que l'antigénicité de ces peptides aléatoires tombe dans la même gamme que celle des peptides immunodominants. Toutefois, la notion de « peptide aléatoire » est difficile à définir, et on ne peut exclure que les variants étudiés ne correspondent pas à un épitope immunodominant dans une quelconque réponse antivirale ou antibactérienne.

D'autre part, on ne peut exclure la possibilité que le HLA-A2 présente une topologie particulière parmi les différents allèles de CMH I, qui favoriserait ou défavoriserait l'interaction avec les segments germinaux des TCR. Nos résultats doivent donc être étendus à des épitopes restreints par d'autres allèles HLA de classe I, et également de classe II.

Enfin, l'étude d'un complexe antigénique du soi, comme l'Ag mâle SMCY/A2 (FIDSYICQV) (Rufer et al., 1998) ou l'Ag d'histocompatibilité mineure HA-1/A2 (VLHDDLLEA) (den Haan et al., 1995), pourrait apporter des informations intéressantes sur le remodelage d'un répertoire T auto-réactif par la sélection négative. Nos données préliminaires indiquent cependant que ces deux Ag, même lorsqu'ils représentent des Ag du non soi (i.e. chez les donneurs qui ne les expriment pas de façon endogène), sont reconnus par un nombre trop limité de cellules T pour que l'on puisse détecter une éventuelle délétion Agspécifique chez les donneurs qui les expriment.

#### C. Limites du modèle humain

L'étude des processus de sélection thymique chez l'homme peut rapidement devenir essentiellement descriptive. Nous avons tenté d'apporter un point de vue mécanistique en travaillant avec des donneurs HLA-A2 négatif, TAP-déficients, ou encore en étudiant des répertoires naïfs irrelevants (le répertoire T CD4+ et le répertoire B) ou immature (le répertoire DP). Cependant, nous avons conscience des limites du modèle humain, notamment pour investiguer le rôle des populations T CD4+ pCMH I-spécifiques au cours de l'initiation d'une réponse immune, ou pour disséquer plus finement la contribution respective des sélections positive et négative dans les remodelages qualitatif et quantitatif du répertoire T Ag-spécifique. D'autre part, un modèle murin serait indispensable à l'étude de la relation entre antigénicité et immunogénicité des complexes pCMH.
#### **III. PERSPECTIVES**

#### A. BASES MOLÉCULAIRES DU DOCKING CONSERVÉ DU TCR SUR SON LIGAND

Les analyses cristallographiques de l'interaction TCR-CMH ont montré que le mode de docking du TCR sur son ligand était globalement conservé, les domaines V $\alpha$  et V $\beta$  contactant toujours les parties peptidiques N- et C-terminales, respectivement (Rudolph et al., 2006). Cependant, aucun point de contact fixe n'a pu être identifié entre les zones conservées des hélices  $\alpha$  du CMH et les résidus conservés du TCR (Garcia et al., 1996; Ding et al., 1998; Reiser et al., 2002). Le mode de docking du TCR sur son ligand est donc imposé soit (i) par les corécepteurs CD4 ou CD8, qui interagissent avec des motifs conservés des pCMH II et I respectivement (Ely et al., 2006; Guimezanes et al., 2001), soit (ii) via un guidage moléculaire lâche, inscrit dans les domaines V du TCR et les hélices α du CMH (Housset et Malissen, 2003). L'usage préférentiel des segments de TCR AV2 et BV17 par les cellules MelA/A2- et MP/A2-spécifiques des compartiments CD8<sup>+</sup> comme CD4<sup>+</sup> supporte l'idée d'une orientation similaire de ces TCR indépendamment de l'expression du corécepteur CD8. Pour formellement démontrer que le mode de docking du TCR n'est pas imposé par les corécepteurs, mais bien par des motifs d'interaction TCR-CMH conservés, nous allons comparer les caractéristiques structurales de TCR isolés de clones T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> en complexe avec leur Ag. Ce travail sera réalisé en collaboration avec l'équipe de D. Housset à Grenoble.

#### B. BASES MOLÉCULAIRES DE LA PEPTIDE-SPÉCIFICITÉ DU TCR

Nous avons montré que certaines populations T  $CD8^+$  pA2-spécifiques isolées de donneurs A2<sup>-</sup> présentaient les mêmes biais de répertoires et les mêmes avidités fonctionnelles que leurs homologues isolées de donneurs A2<sup>+</sup>, tout en exprimant un TCR beaucoup plus peptide-dégénéré. Pour comprendre plus finement les mécanismes de sélections négatives qui éliminent présumément ces cellules peptide-aspécifiques du répertoire T A2<sup>+</sup>, nous allons entreprendre une analyse cristallographique de MelA/A2 en complexe avec un TCR peptide-spécifique *vs* peptide-dégénéré, c'est-à-dire isolé d'un donneur A2<sup>+</sup> *vs* A2<sup>-</sup>.

## C. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET FONCTIONNELLE DES LYMPHOCYTES B PCMH I-spécifiques

Le protocole d'enrichissement immunomagnétique des PBMC marqués par des tétramères de complexes pCMH I a permis la détection de cellules tétramère<sup>+</sup> au sein des lymphocytes CD3<sup>-</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup>, c'est-à-dire des lymphocytes B. De plus, un enrichissement simultané des PBMC après marquage par deux tétramères distincts a montré que ces cellules B fixaient le CMH de façon peptide-spécifique *ex vivo*. Nous aimerions maintenant approfondir la caractérisation phénotypique de ces populations B, et investiguer leurs propriétés fonctionnelles *in vitro*, en collaboration avec l'équipe de J.P. Soulillou à Nantes (Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation, ITERT). En particulier, nous voudrions dériver des plasmocytes produisant des Ac anti-pCMH, afin (i) d'étudier les aspects structuraux de l'interaction Ac-pCMH en comparaison à l'interaction TCR-pCMH, (ii) d'investiguer l'expression des peptides PGT et MelA dans le thymus par des techniques d'imagerie. D'autre part, l'obtention d'Ac spécifiques de complexes pCMH donnés pourrait constituer une avancée technologique majeure pour le ciblage de cellules tumorales exprimant l'Ag *ad hoc*, avec une visée aussi bien diagnostique que thérapeutique.

## D. Suivi de réponses T allo-spécifiques chez des receveurs allotransplantés rénaux.

On sait que les lymphocytes B et T jouent tous deux un rôle clef dans la survie des allogreffes. Cependant, la contribution respective de ces deux sous populations, ainsi que les processus déclencheurs des réponses immunitaires allo-spécifiques restent mal compris. Les tissus allogéniques peuvent initier une réponse immune via au moins deux mécanismes distincts, définis comme l'alloréactivité directe et indirecte, et qui correspondent respectivement à une reconnaissance T de complexes pCMH allogéniques ou de peptides dérivés de CMH allogéniques présentés par des molécules de CMH endogène (du receveur). Le rôle du peptide antigénique dans l'alloréactivité directe reste débattu. Tandis qu'un premier modèle propose que les cellules T alloréactives reconnaissent des résidus polymorphes du CMH allogénique indépendamment du peptide présenté (Kaye et al., 1984; Bevan, 1984), un second modèle postule que les TCR alloréactifs reconnaissent leur ligand de façon peptide-dépendante, et exploitent les similarités entre les hélices  $\alpha$  des différentes molécules du CMH (Matzinger, 1993).

En documentant chez des donneurs A2 négatifs des populations T liant des multimères pA2 de façon peptide-spécifique, et présentant les mêmes biais de répertoires que leurs homologues  $A2^+$ , nos données confortent ce second modèle, qui est également appuyé par les observations structurales que les TCR alloréactifs contactent systématiquement à la fois le peptide et le CMH (Housset et Malissen, 2003). Cependant, nous avons montré in vitro que les populations T alloréactives marquées par les multimères MelA/A2 et PGT/A2 reconnaissent des cellules cibles de façon A2-dépendante, mais peptide-indépendante, tandis que leurs homologues isolées de donneurs A2<sup>+</sup> sont strictement peptide-spécifiques. Ces observations supportent un modèle de l'alloréactivité basé sur la reconnaissance de résidus polymorphes du CMH, et sont également en accord avec l'idée qu'il existe des motifs d'interaction conservés entre les segments germinaux des TCR et les hélices  $\alpha$  des CMH. Nous voudrions maintenant évaluer la pertinence physiologique de ces observations. En collaboration avec l'équipe de J.P. Soulillou à Nantes, nous allons étudier la contribution de l'alloréactivité directe au rejet ou à la tolérance d'allogreffes rénales. En particulier, nous voudrions investiguer les éventuelles corrélations entre les devenirs des allogreffes et les caractéristiques fonctionnelles, phénotypiques, de peptide-dépendance et de fréquence des cellules T et B alloréactives, spécifiques de peptides A2-restreints déjà décrits dans la littérature (Ishizaki et al., 2006; Ramage et al., 2004; Rufer et al., 1998; den Haan, 1998; Brickner et al., 2001).

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Aebischer, T., Oehen, S., et Hengartner, H. (1990). Preferential usage of V alpha 4 and V beta 10 T cell receptor genes by lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein-specific H-2Db-restricted cytotoxic T cells. *Eur. J. Immunol*, **20**, 523-531.
- Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H., et Komiyama, A. (2000). CD27: a memory Bcell marker. *Immunol. Today*, **21**, 204-206.
- Aifantis, I., Buer, J., von Boehmer, H., et Azogui, O. (1997). Essential role of the pre-T cell receptor in allelic exclusion of the T cell receptor beta locus. *Immunity*, 7, 601-607.
- Alanio, C., Lemaitre, F., Law, H. K. W., Hasan, M., et Albert, M. L. (2010). Enumeration of human antigen-specific naive CD8+ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood*, 115, 3718-3725.
- Alarcon, B., Berkhout, B., Breitmeyer, J., et Terhorst, C. (1988). Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3-gamma.delta.epsilon core and single T cell receptor alpha or beta chains. *J. Biol. Chem*, **263**, 2953-2961.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., et Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigenspecific T lymphocytes. *Science*, 274, 94-96.
- Arden, B., Clark, S. P., Kabelitz, D., et Mak, T. W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*, 42, 455-500.
- Arstila, T. P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., et Kourilsky, P. (1999). A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*, 286, 958-961.
- Ashton-Rickardt, P. G., Bandeira, A., Delaney, J. R., Van Kaer, L., Pircher, H. P., Zinkernagel, R. M., et Tonegawa, S. (1994). Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell*, 76, 651-663.
- Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., et Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, 439, 682-687.
- Benoist, C. et Mathis, D. (1989). Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell*, **58**, 1027-1033.
- Berg, L. J. et Davis, M. M. (1989). T-cell development in T cell receptor alphabeta transgenic mice. *Semin. Immunol*, 1, 105-116.
- Bevan, M. (1984). High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunology Today*, **5**, 128-130.
- Bevan, M. J. (1977). In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature*, **269**, 417-418.
- Bhakta, N. R. et Lewis, R. S. (2005). Real-time measurement of signaling and motility during T cell development in the thymus. *Semin. Immunol*, **17**, 411-420.

- Blackman, M., Yagüe, J., Kubo, R., Gay, D., Coleclough, C., Palmer, E., Kappler, J., et Marrack, P. (1986). The T cell repertoire may be biased in favor of MHC recognition. *Cell*, 47, 349-357.
- Blattman, J. N., Antia, R., Sourdive, D. J. D., Wang, X., Kaech, S. M., Murali-Krishna, K., Altman, J. D., et Ahmed, R. (2002). Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. J. Exp. Med, 195, 657-664.
- van Bleek, G. M. et Nathenson, S. G. (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**, 11032-11036.
- Bodinier, M., Peyrat, M. A., Tournay, C., Davodeau, F., Romagne, F., Bonneville, M., et Lang, F. (2000). Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat. Med*, 6, 707-710.
- von Boehmer, H., Haas, W., et Jerne, N. K. (1978). Major histocompatibility complexlinked immune-responsiveness is acquired by lymphocytes of low-responder mice differentiating in thymus of high-responder mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 75, 2439-2442.
- Bonasio, R. et von Andrian, U. H. (2006). Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol*, 18, 503-511.
- Boniface, J. J., Rabinowitz, J. D., Wülfing, C., Hampl, J., Reich, Z., Altman, J. D., Kantor, R. M., Beeson, C., McConnell, H. M., et Davis, M. M. (1998). Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected]. *Immunity*, 9, 459-466.
- Bonneville, M. et Saulquin, X. (2005). T-cell Receptors. Dans, John Wiley & Sons, Ltd (éd), *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Borst, J., Alexander, S., Elder, J., et Terhorst, C. (1983). The T3 complex on human T lymphocytes involves four structurally distinct glycoproteins. *J. Biol. Chem*, **258**, 5135-5141.
- Boursalian, T. E., Golob, J., Soper, D. M., Cooper, C. J., et Fink, P. J. (2004). Continued maturation of thymic emigrants in the periphery. *Nat. Immunol*, **5**, 418-425.
- Bousso, P., Bhakta, N. R., Lewis, R. S., et Robey, E. (2002). Dynamics of thymocytestromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science*, **296**, 1876-1880.
- Bowlus, C. (1999). Cloning of a Novel MHC-Encoded Serine Peptidase Highly Expressed by Cortical Epithelial Cells of the Thymus. *Cellular Immunology*, **196**, 80-86.
- Boyle, L. H., Goodall, J. C., et Gaston, J. S. H. (2004). Major histocompatibility complex class I-restricted alloreactive CD4+ T cells. *Immunology*, **112**, 54-63.
- Brickner, A. G., Warren, E. H., Caldwell, J. A., Akatsuka, Y., Golovina, T. N., Zarling,
  A. L., Shabanowitz, J., Eisenlohr, L. C., Hunt, D. F., Engelhard, V. H., et al.
  (2001). The immunogenicity of a new human minor histocompatibility antigen results

from differential antigen processing. J. Exp. Med, 193, 195-206.

- Brigl, M. et Brenner, M. B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol*, 22, 817-890.
- Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T. I., Yamashita, Y., Sharrow, S. O., et Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity*, 13, 59-71.
- Call, M. E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., et Wucherpfennig, K. W. (2002). The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell*, **111**, 967-979.
- Call, M. E. et Wucherpfennig, K. W. (2004). Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol. Immunol*, **40**, 1295-1305.
- Campbell, J. J., Pan, J., et Butcher, E. C. (1999). Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J. Immunol*, 163, 2353-2357.
- Candéias, S., Waltzinger, C., Benoist, C., et Mathis, D. (1991). The V beta 17+ T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells. J. Exp. Med, 174, 989-1000.
- Casanova, J. L., Romero, P., Widmann, C., Kourilsky, P., et Maryanski, J. L. (1991). T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a Plasmodium berghei nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. J. Exp. Med, 174, 1371-1383.
- Chan, S. H., Cosgrove, D., Waltzinger, C., Benoist, C., et Mathis, D. (1993). Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell*, **73**, 225-236.
- Choi, E. M., Chen, J., Wooldridge, L., Salio, M., Lissina, A., Lissin, N., Hermans, I. F., Silk, J. D., Mirza, F., Palmowski, M. J., et al. (2003). High avidity antigen-specific CTL identified by CD8-independent tetramer staining. J. Immunol, 171, 5116-5123.
- Cole, D. K., Yuan, F., Rizkallah, P. J., Miles, J. J., Gostick, E., Price, D. A., Gao, G. F., Jakobsen, B. K., et Sewell, A. K. (2009). Germ line-governed recognition of a cancer epitope by an immunodominant human T-cell receptor. *J. Biol. Chem*, 284, 27281-27289.
- Correia-Neves, M., Waltzinger, C., Mathis, D., et Benoist, C. (2001). The shaping of the T cell repertoire. *Immunity*, 14, 21-32.
- Corthay, A., Nandakumar, K. S., et Holmdahl, R. (2001). Evaluation of the percentage of peripheral T cells with two different T cell receptor alpha-chains and of their potential role in autoimmunity. *J. Autoimmun*, 16, 423-429.
- Coux, O., Tanaka, K., et Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem*, **65**, 801-847.
- Crawford, F., Kozono, H., White, J., Marrack, P., et Kappler, J. (1998). Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II MHC covalent peptide

complexes. Immunity, 8, 675-682.

- Dai, S., Huseby, E. S., Rubtsova, K., Scott-Browne, J., Crawford, F., Macdonald, W. A., Marrack, P., et Kappler, J. W. (2008). Crossreactive T Cells spotlight the germline rules for alphabeta T cell-receptor interactions with MHC molecules. *Immunity*, 28, 324-334.
- Daniels, M. A. et Jameson, S. C. (2000). Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. J. Exp. Med, 191, 335-346.
- Daniels, M. A., Teixeiro, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Holländer, G. A., Gascoigne, N. R. J., et Palmer, E. (2006). Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature*, 444, 724-729.
- Darrow, T. L., Abdel-Wahab, Z., Quinn-Allen, M. A., et Seigler, H. F. (1996). Recognition and lysis of human melanoma by a CD3+, CD4+, CD8- T-cell clone restricted by HLA-A2. *Cell. Immunol*, **172**, 52-59.
- David-Ameline, J., Lim, A., Davodeau, F., Peyrat, M. A., Berthelot, J. M., Semana, G., Pannetier, C., Gaschet, J., Vie, H., Even, J., et al. (1996). Selection of T cells reactive against autologous B lymphoblastoid cells during chronic rheumatoid arthritis. J. Immunol, 157, 4697-4706.
- Davis, C. B., Killeen, N., Crooks, M. E., Raulet, D., et Littman, D. R. (1993). Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes. *Cell*, 73, 237-247.
- Day, C. L., Shea, A. K., Altfeld, M. A., Olson, D. P., Buchbinder, S. P., Hecht, F. M., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., et Kalams, S. A. (2001). Relative dominance of epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons with shared HLA alleles. J. Virol, 75, 6279-6291.
- **De Rosa, S. C., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A., et Roederer, M.** (2001). 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat. Med*, **7**, 245-248.
- Degermann, S., Surh, C. D., Glimcher, L. H., Sprent, J., et Lo, D. (1994). B7 expression on thymic medullary epithelium correlates with epithelium-mediated deletion of V beta 5+ thymocytes. J. Immunol, 152, 3254-3263.
- Demotz, S., Grey, H. M., et Sette, A. (1990). The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. *Science*, **249**, 1028-1030.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., et Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol*, 2, 1032-1039.
- Derbinski, J., Gäbler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhahn, M., Peltonen, L., Walter, J., et Kyewski, B. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med*, **202**, 33-45.

- Derbinski, J., Pinto, S., Rösch, S., Hexel, K., et Kyewski, B. (2008). Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 105, 657-662.
- **Dietrich, J., Cella, M., et Colonna, M.** (2001). Ig-like transcript 2 (ILT2)/leukocyte Ig-like receptor 1 (LIR1) inhibits TCR signaling and actin cytoskeleton reorganization. *J. Immunol*, **166**, 2514-2521.
- Dietrich, P., Le Gal, F., Dutoit, V., Pittet, M. J., Trautman, L., Zippelius, A., Cognet, I., Widmer, V., Walker, P. R., Michielin, O., et al. (2003). Prevalent role of TCR alpha-chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumorassociated self-antigen. J. Immunol, 170, 5103-5109.
- **Ding, Y. H., Smith, K. J., Garboczi, D. N., Utz, U., Biddison, W. E., et Wiley, D. C.** (1998). Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity*, **8**, 403-411.
- Donskoy, E. et Goldschneider, I. (2003). Two developmentally distinct populations of dendritic cells inhabit the adult mouse thymus: demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *J. Immunol*, 170, 3514-3521.
- **Doyle, C. et Strominger, J. L.** (1987). Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*, **330**, 256-259.
- Dutoit, V., Rubio-Godoy, V., Pittet, M. J., Zippelius, A., Dietrich, P., Legal, F. A., Guillaume, P., Romero, P., Cerottini, J., Houghten, R. A., et al. (2002).
  Degeneracy of antigen recognition as the molecular basis for the high frequency of naive A2/Melan-a peptide multimer(+) CD8(+) T cells in humans. J. Exp. Med, 196, 207-216.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., et Hood, L. (1980). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell*, **19**, 981-992.
- Ely, L. K., Beddoe, T., Clements, C. S., Matthews, J. M., Purcell, A. W., Kjer-Nielsen, L., McCluskey, J., et Rossjohn, J. (2006). Disparate thermodynamics governing T cell receptor-MHC-I interactions implicate extrinsic factors in guiding MHC restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103, 6641-6646.
- Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G., et Rammensee, H. G. (1991). Allelespecific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, **351**, 290-296.
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L. J., Rosen, H., et McHeyzer-Williams, M. G. (2009). The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol*, **10**, 375-384.
- Fehling, H. J., Swat, W., Laplace, C., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, U., et von Boehmer, H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science*, 265, 1234-1237.
- Felix, N. J. et Allen, P. M. (2007). Specificity of T-cell alloreactivity. Nat. Rev. Immunol, 7,

942-953.

- Feng, D., Bond, C. J., Ely, L. K., Maynard, J., et Garcia, K. C. (2007). Structural evidence for a germline-encoded T cell receptor-major histocompatibility complex interaction 'codon'. *Nat. Immunol*, 8, 975-983.
- Fink, P. J. et Bevan, M. J. (1995). Positive selection of thymocytes. Adv. Immunol, 59, 99-133.
- Fowlkes, B. J. et Ramsdell, F. (1993). T-cell tolerance. Curr. Opin. Immunol, 5, 873-879.
- Fremont, D. H., Matsumura, M., Stura, E. A., Peterson, P. A., et Wilson, I. A. (1992). Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science*, **257**, 919-927.
- Fugmann, S. D., Lee, A. I., Shockett, P. E., Villey, I. J., et Schatz, D. G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu. Rev. Immunol*, 18, 495-527.
- Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., et Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, **384**, 134-141.
- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., et Wilson, I. A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 A and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*, **274**, 209-219.
- Gascoigne, N. R. J. (2008). Do T cells need endogenous peptides for activation? *Nat. Rev. Immunol*, 8, 895-900.
- Gervois, N., Guilloux, Y., Diez, E., et Jotereau, F. (1996). Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *J. Exp. Med*, **183**, 2403-2407.
- Gotch, F., Rothbard, J., Howland, K., Townsend, A., et McMichael, A. (1987). Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2. *Nature*, **326**, 881-882.
- Gottschalk, L. R. et Leiden, J. M. (1990). Identification and functional characterization of the human T-cell receptor beta gene transcriptional enhancer: common nuclear proteins interact with the transcriptional regulatory elements of the T-cell receptor alpha and beta genes. *Mol. Cell. Biol*, 10, 5486-5495.
- Gras, S., Kjer-Nielsen, L., Burrows, S. R., McCluskey, J., et Rossjohn, J. (2008). T-cell receptor bias and immunity. *Curr. Opin. Immunol*, **20**, 119-125.
- Gras, S., Saulquin, X., Reiser, J., Debeaupuis, E., Echasserieau, K., Kissenpfennig, A., Legoux, F., Chouquet, A., Le Gorrec, M., Machillot, P., et al. (2009). Structural bases for the affinity-driven selection of a public TCR against a dominant human cytomegalovirus epitope. J. Immunol, 183, 430-437.
- Grawunder, U., West, R. B., et Lieber, M. R. (1998). Antigen receptor gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol*, 10, 172-180.

- Guillaume, P., Legler, D. F., Boucheron, N., Doucey, M., Cerottini, J., et Luescher, I. F. (2003). Soluble major histocompatibility complex-peptide octamers with impaired CD8 binding selectively induce Fas-dependent apoptosis. J. Biol. Chem, 278, 4500-4509.
- Guimezanes, A., Barrett-Wilt, G. A., Gulden-Thompson, P., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., Schmitt-Verhulst, A. M., et Engelhardt, V. H. (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**, 421-432.
- den Haan, J., Sherman, N., Blokland, E., Huczko, E., Koning, F., Drijfhout, J., Skipper, J., Shabanowitz, J., Hunt, D., Engelhard, V., et al. (1995). Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science*, 268, 1476-1480.
- den Haan, J. M. (1998). The Minor Histocompatibility Antigen HA-1: A Diallelic Gene with a Single Amino Acid Polymorphism. *Science*, **279**, 1054-1057.
- Haluszczak, C., Akue, A. D., Hamilton, S. E., Johnson, L. D. S., Pujanauski, L., Teodorovic, L., Jameson, S. C., et Kedl, R. M. (2009). The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. J. Exp. Med, 206, 435-448.
- Hamad, A. R., O'Herrin, S. M., Lebowitz, M. S., Srikrishnan, A., Bieler, J., Schneck, J., et Pardoll, D. (1998). Potent T cell activation with dimeric peptide-major histocompatibility complex class II ligand: the role of CD4 coreceptor. *J. Exp. Med*, 188, 1633-1640.
- Hare, B. J., Wyss, D. F., Osburne, M. S., Kern, P. S., Reinherz, E. L., et Wagner, G. (1999). Structure, specificity and CDR mobility of a class II restricted single-chain Tcell receptor. *Nat. Struct. Biol*, 6, 574-581.
- Haughn, L., Gratton, S., Caron, L., Sékaly, R. P., Veillette, A., et Julius, M. (1992). Association of tyrosine kinase p56lck with CD4 inhibits the induction of growth through the alpha beta T-cell receptor. *Nature*, **358**, 328-331.
- Hazenberg, M. D., Verschuren, M. C., Hamann, D., Miedema, F., et van Dongen, J. J. (2001). T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. J. Mol. Med, 79, 631-640.
- He, X., Janeway, C. A., Levine, M., Robinson, E., Preston-Hurlburt, P., Viret, C., et Bottomly, K. (2002). Dual receptor T cells extend the immune repertoire for foreign antigens. *Nat. Immunol*, **3**, 127-134.
- Heath, V. L., Moore, N. C., Parnell, S. M., et Mason, D. W. (1998). Intrathymic expression of genes involved in organ specific autoimmune disease. *J. Autoimmun*, **11**, 309-318.
- Heath, W. R., Carbone, F. R., Bertolino, P., Kelly, J., Cose, S., et Miller, J. F. (1995). Expression of two T cell receptor alpha chains on the surface of normal murine T cells. *Eur. J. Immunol*, 25, 1617-1623.

- Hennecke, J. et Wiley, D. C. (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, 571-581.
- Hogquist, K. A., Gavin, M. A., et Bevan, M. J. (1993). Positive selection of CD8+ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J. Exp. Med*, **177**, 1469-1473.
- Holst, J., Wang, H., Eder, K. D., Workman, C. J., Boyd, K. L., Baquet, Z., Singh, H., Forbes, K., Chruscinski, A., Smeyne, R., et al. (2008). Scalable signaling mediated by T cell antigen receptor-CD3 ITAMs ensures effective negative selection and prevents autoimmunity. *Nat. Immunol*, 9, 658-666.
- Honey, K., Nakagawa, T., Peters, C., et Rudensky, A. (2002). Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. J. Exp. Med, 195, 1349-1358.
- Honey, K. et Rudensky, A. Y. (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol*, **3**, 472-482.
- Housset, D., Mazza, G., Grégoire, C., Piras, C., Malissen, B., et Fontecilla-Camps, J. C. (1997). The three-dimensional structure of a T-cell antigen receptor V alpha V beta heterodimer reveals a novel arrangement of the V beta domain. *EMBO J*, 16, 4205-4216.
- Housset, D. et Malissen, B. (2003). What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity? *Trends Immunol*, **24**, 429-437.
- Houston, E. G., Nechanitzky, R., et Fink, P. J. (2008). Cutting edge: Contact with secondary lymphoid organs drives postthymic T cell maturation. *J. Immunol*, 181, 5213-5217.
- Hu, Q., Bazemore Walker, C. R., Girao, C., Opferman, J. T., Sun, J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., et Ashton-Rickardt, P. G. (1997). Specific recognition of thymic selfpeptides induces the positive selection of cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 7, 221-231.
- Huang, J., Zarnitsyna, V. I., Liu, B., Edwards, L. J., Jiang, N., Evavold, B. D., et Zhu, C. (2010). The kinetics of two-dimensional TCR and pMHC interactions determine Tcell responsiveness. *Nature*, 464, 932-936.
- Hugo, P., Kappler, J. W., McCormack, J. E., et Marrack, P. (1993). Fibroblasts can induce thymocyte positive selection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90, 10335-10339.
- Huppa, J. B. et Ploegh, H. L. (1997). In vitro translation and assembly of a complete T cell receptor-CD3 complex. *J. Exp. Med*, **186**, 393-403.
- Huppa, J. B., Axmann, M., Mörtelmaier, M. A., Lillemeier, B. F., Newell, E. W., Brameshuber, M., Klein, L. O., Schütz, G. J., et Davis, M. M. (2010). TCRpeptide-MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity.

Nature, 463, 963-967.

- Huseby, E. S., Crawford, F., White, J., Kappler, J., et Marrack, P. (2003). Negative selection imparts peptide specificity to the mature T cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **100**, 11565-11570.
- Huseby, E. S., White, J., Crawford, F., Vass, T., Becker, D., Pinilla, C., Marrack, P., et Kappler, J. W. (2005). How the T cell repertoire becomes peptide and MHC specific. *Cell*, 122, 247-260.
- Ignatowicz, L., Kappler, J., et Marrack, P. (1996). The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell*, **84**, 521-529.
- Ignatowicz, L., Rees, W., Pacholczyk, R., Ignatowicz, H., Kushnir, E., Kappler, J., et Marrack, P. (1997). T cells can be activated by peptides that are unrelated in sequence to their selecting peptide. *Immunity*, 7, 179-186.
- Irvine, D. J., Purbhoo, M. A., Krogsgaard, M., et Davis, M. M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature*, **419**, 845-849.
- Ishizaki, H., Tsunoda, T., Wada, S., Yamauchi, M., Shibuya, M., et Tahara, H. (2006). Inhibition of tumor growth with antiangiogenic cancer vaccine using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 1. *Clin. Cancer Res*, 12, 5841-5849.
- Itano, A., Kioussis, D., et Robey, E. (1994). Stochastic component to development of class I major histocompatibility complex-specific T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **91**, 220-224.
- Itano, A. et Robey, E. (2000). Highly efficient selection of CD4 and CD8 lineage thymocytes supports an instructive model of lineage commitment. *Immunity*, **12**, 383-389.
- Itano, A., Salmon, P., Kioussis, D., Tolaini, M., Corbella, P., et Robey, E. (1996). The cytoplasmic domain of CD4 promotes the development of CD4 lineage T cells. J. Exp. Med, 183, 731-741.
- Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A., et Pape, K. A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol*, **19**, 23-45.
- Jerne, N. K. (1971). The somatic generation of immune recognition. Eur. J. Immunol, 1, 1-9.
- Johnson, R. P., Trocha, A., Yang, L., Mazzara, G. P., Panicali, D. L., Buchanan, T. M., et Walker, B. D. (1991). HIV-1 gag-specific cytotoxic T lymphocytes recognize multiple highly conserved epitopes. Fine specificity of the gag-specific response defined by using unstimulated peripheral blood mononuclear cells and cloned effector cells. J. Immunol, 147, 1512-1521.
- Kappler, J., Kubo, R., Haskins, K., Hannum, C., Marrack, P., Pigeon, M., McIntyre, B., Allison, J., et Trowbridge, I. (1983). The major histocompatibility complexrestricted antigen receptor on T cells in mouse and man: identification of constant and variable peptides. *Cell*, 35, 295-302.

- Kasai, M., Kominami, E., et Mizuochi, T. (1998). The antigen presentation pathway in medullary thymic epithelial cells, but not that in cortical thymic epithelial cells, conforms to the endocytic pathway. *Eur. J. Immunol*, **28**, 1867-1876.
- Kawakami, Y. et Rosenberg, S. A. (1997). Immunobiology of human melanoma antigens MART-1 and gp100 and their use for immuno-gene therapy. *Int. Rev. Immunol*, 14, 173-192.
- Kaye, J., Jones, B., et Janeway, C. A. (1984). The structure and function of T cell receptor complexes. *Immunol. Rev*, **81**, 39-63.
- Kedzierska, K., Turner, S. J., et Doherty, P. C. (2004). Conserved T cell receptor usage in primary and recall responses to an immunodominant influenza virus nucleoprotein epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **101**, 4942-4947.
- Keefe, R. (1999). Regulation of Lineage Commitment Distinct from Positive Selection. Science, 286, 1149-1153.
- Kerry, S. E., Buslepp, J., Cramer, L. A., Maile, R., Hensley, L. L., Nielsen, A. I., Kavathas, P., Vilen, B. J., Collins, E. J., et Frelinger, J. A. (2003). Interplay between TCR affinity and necessity of coreceptor ligation: high-affinity peptide-MHC/TCR interaction overcomes lack of CD8 engagement. J. Immunol, 171, 4493-4503.
- Kjer-Nielsen, L., Clements, C. S., Purcell, A. W., Brooks, A. G., Whisstock, J. C., Burrows, S. R., McCluskey, J., et Rossjohn, J. (2003). A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity*, 18, 53-64.
- Klein, L., Klein, T., Rüther, U., et Kyewski, B. (1998). CD4 T cell tolerance to human Creactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J. Exp. Med*, **188**, 5-16.
- Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A., Tuohy, V. K., et Kyewski, B. (2000). Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med*, **6**, 56-61.
- Klein, L., Roettinger, B., et Kyewski, B. (2001). Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance. *Eur. J. Immunol*, **31**, 2476-2486.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., et Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol*, 9, 833-844.
- Kloetzel, P. M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, **2**, 179-187.
- Kobayashi, H., Kimura, S., Aoki, N., Sato, K., Celis, E., et Katagiri, M. (2001). Existence of MHC class I-restricted alloreactive CD4+ T cells reacting with peptide transporter-deficient cells. *Immunogenetics*, **53**, 626-633.

- Koble, C. et Kyewski, B. (2009). The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J. Exp. Med*, **206**, 1505-1513.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., et Alt, F. W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science*, 261, 1171-1175.
- Krogsgaard, M. et Davis, M. M. (2005). How T cells 'see' antigen. Nat. Immunol, 6, 239-245.
- Kruisbeek, A. M., Nieland, J. D., et Jones, L. A. (1992). Mechanism of tolerance induction. *Adv. Exp. Med. Biol*, **323**, 101-109.
- Kyewski, B. et Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol*, 4, 688-698.
- Lafaille, J. J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y., et Tonegawa, S. (1989). Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell*, **59**, 859-870.
- Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D., et Glimcher, L. H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature*, 383, 81-85.
- Laufer, T. M., Glimcher, L. H., et Lo, D. (1999). Using thymus anatomy to dissect T cell repertoire selection. *Semin. Immunol*, **11**, 65-70.
- Lawson, T. M. (2001). Influenza A antigen exposure selects dominant Vbeta17+ TCR in human CD8+ cytotoxic T cell responses. *International Immunology*, 13, 1373-1381.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L., et Phillips, J. H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J. Immunol*, **157**, 4741-4745.
- Le Borgne, M., Ladi, E., Dzhagalov, I., Herzmark, P., Liao, Y. F., Chakraborty, A. K., et Robey, E. A. (2009). The impact of negative selection on thymocyte migration in the medulla. *Nat. Immunol*, **10**, 823-830.
- Legoux, F., Debeaupuis, E., Echasserieau, K., De La Salle, H., Saulquin, X., et Bonneville, M. (2010). Impact of TCR reactivity and HLA phenotype on naive CD8 T cell frequency in humans. J. Immunol, 184, 6731-6738.
- Lehner, P. J., Wang, E. C., Moss, P. A., Williams, S., Platt, K., Friedman, S. M., Bell, J. I., et Borysiewicz, L. K. (1995). Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment. J. Exp. Med, 181, 79-91.
- Leung, R. K., Thomson, K., Gallimore, A., Jones, E., Van den Broek, M., Sierro, S., Alsheikhly, A. R., McMichael, A., et Rahemtulla, A. (2001). Deletion of the CD4 silencer element supports a stochastic mechanism of thymocyte lineage commitment. *Nat. Immunol*, 2, 1167-1173.

- Levelt, C. N. et Eichmann, K. (1995). Receptors and signals in early thymic selection. *Immunity*, **3**, 667-672.
- Li, J., Park, J., Foss, D., et Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. J. Exp. Med, 206, 607-622.
- Li, J., Iwanami, N., Hoa, V. Q., Furutani-Seiki, M., et Takahama, Y. (2007). Noninvasive intravital imaging of thymocyte dynamics in medaka. *J. Immunol*, **179**, 1605-1615.
- Li, W., Kim, M., Gourley, T. S., McCarthy, B. P., Sant'Angelo, D. B., et Chang, C. (2005). An alternate pathway for CD4 T cell development: thymocyte-expressed MHC class II selects a distinct T cell population. *Immunity*, **23**, 375-386.
- Lieber, M. R. (1991). Site-specific recombination in the immune system. *FASEB J*, **5**, 2934-2944.
- Lin, W. C. et Desiderio, S. (1994). Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein RAG-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **91**, 2733-2737.
- Love, P. E., Lee, J., et Shores, E. W. (2000). Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection. *J. Immunol*, **165**, 3080-3087.
- Madden, D. R., Garboczi, D. N., et Wiley, D. C. (1993). The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*, **75**, 693-708.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P. A., Scollay, R., et Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol. Today*, **13**, 315-322.
- Marrack, P., Bender, J., Jordan, M., Rees, W., Robertson, J., Schaefer, B. C., et Kappler, J. (2001). Major histocompatibility complex proteins and TCRs: do they really go together like a horse and carriage? *J. Immunol*, **167**, 617-621.
- Marrack, P., Scott-Browne, J. P., Dai, S., Gapin, L., et Kappler, J. W. (2008). Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu. Rev. Immunol*, 26, 171-203.
- Mason, D. (1998). A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today*, **19**, 395-404.
- Matzinger, P. (1993). Why positive selection? Immunol. Rev, 135, 81-117.
- Matzinger, P. et Bevan, M. J. (1977). Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell. Immunol*, **29**, 1-5.
- McHeyzer-Williams, M. G. et Davis, M. M. (1995). Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo. *Science*, **268**, 106-111.
- van Meerwijk, J. P., Marguerat, S., Lees, R. K., Germain, R. N., Fowlkes, B. J., et MacDonald, H. R. (1997). Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. J. Exp. Med, 185, 377-383.

- Merkenschlager, M., Graf, D., Lovatt, M., Bommhardt, U., Zamoyska, R., et Fisher, A. G. (1997). How many thymocytes audition for selection? J. Exp. Med, 186, 1149-1158.
- van der Merwe, P. A. et Davis, S. J. (2003). Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu. Rev. Immunol*, **21**, 659-684.
- Millet, V., Naquet, P., et Guinamard, R. R. (2008). Intercellular MHC transfer between thymic epithelial and dendritic cells. *Eur. J. Immunol*, **38**, 1257-1263.
- Moon, J. J., Chu, H. H., Hataye, J., Pagán, A. J., Pepper, M., McLachlan, J. B., Zell, T., et Jenkins, M. K. (2009). Tracking epitope-specific T cells. *Nat Protoc*, 4, 565-581.
- Moon, J. J., Chu, H. H., Pepper, M., McSorley, S. J., Jameson, S. C., Kedl, R. M., et Jenkins, M. K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity*, **27**, 203-213.
- Moss, P. A., Moots, R. J., Rosenberg, W. M., Rowland-Jones, S. J., Bodmer, H. C., McMichael, A. J., et Bell, J. I. (1991). Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 88, 8987-8990.
- Münz, C. (2009). Enhancing immunity through autophagy. *Annu. Rev. Immunol*, **27**, 423-449.
- Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., et Tanaka, K. (2007). Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*, **316**, 1349-1353.
- Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., et Klein, L. (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature*, 455, 396-400.
- Neveu, B., Echasserieau, K., Hill, T., Kuus-Reichel, K., Houssaint, E., Bonneville, M., et Saulquin, X. (2006). Impact of CD8-MHC class I interaction in detection and sorting efficiencies of antigen-specific T cells using MHC class I/peptide multimers: contribution of pMHC valency. *Int. Immunol*, **18**, 1139-1145.
- Neveu, B., Debeaupuis, E., Echasserieau, K., le Moullac-Vaidye, B., Gassin, M., Jegou, L., Decalf, J., Albert, M., Ferry, N., Gournay, J., et al. (2008). Selection of high-avidity CD8 T cells correlates with control of hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 48, 713-722.
- Ngo, V. N., Tang, H. L., et Cyster, J. G. (1998). Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J. Exp. Med*, **188**, 181-191.
- Nishimura, M. I., Avichezer, D., Custer, M. C., Lee, C. S., Chen, C., Parkhurst, M. R., Diamond, R. A., Robbins, P. F., Schwartzentruber, D. J., et Rosenberg, S. A. (1999). MHC class I-restricted recognition of a melanoma antigen by a human CD4+ tumor infiltrating lymphocyte. *Cancer Res*, **59**, 6230-6238.

- Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A. M., Ishimaru, N., Koyasu, S., Tanaka, K., et Takahama, Y. (2010). Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity*, **32**, 29-40.
- Nolte, M. A., van Olffen, R. W., van Gisbergen, K. P. J. M., et van Lier, R. A. W. (2009). Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunol. Rev*, **229**, 216-231.
- Norment, A. M., Salter, R. D., Parham, P., Engelhard, V. H., et Littman, D. R. (1988). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*, **336**, 79-81.
- Nossal, G. J. (1993). Tolerance and ways to break it. Ann. N. Y. Acad. Sci, 690, 34-41.
- Obar, J. J., Khanna, K. M., et Lefrançois, L. (2008). Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity*, 28, 859-869.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., et Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, **248**, 1517-1523.
- Oukka, M., Andre, P., Turmel, P., Besnard, N., Angevin, V., Karlsson, L., Trans, P. L., Charron, D., Bihain, B., Kosmatopoulos, K., et al. (1997). Selectivity of the major histocompatibility complex class II presentation pathway of cortical thymic epithelial cell lines. *Eur. J. Immunol*, **27**, 855-859.
- Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol*, **3**, 383-391.
- Pasqual, N., Gallagher, M., Aude-Garcia, C., Loiodice, M., Thuderoz, F., Demongeot, J., Ceredig, R., Marche, P. N., et Jouvin-Marche, E. (2002). Quantitative and qualitative changes in V-J alpha rearrangements during mouse thymocytes differentiation: implication for a limited T cell receptor alpha chain repertoire. *J. Exp. Med*, 196, 1163-1173.
- Pawlowski, T., Elliott, J. D., Loh, D. Y., et Staerz, U. D. (1993). Positive selection of T lymphocytes on fibroblasts. *Nature*, 364, 642-645.
- Pittet, M. J., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Guillaume, P., Batard, P., Speiser, D., Luescher, I., Cerottini, J., Romero, P., et Zippelius, A. (2003). Alpha 3 domain mutants of peptide/MHC class I multimers allow the selective isolation of high avidity tumor-reactive CD8 T cells. J. Immunol, 171, 1844-1849.
- Pittet, M. J., Zippelius, A., Valmori, D., Speiser, D. E., Cerottini, J., et Romero, P. (2002). Melan-A/MART-1-specific CD8 T cells: from thymus to tumor. *Trends Immunol*, **23**, 325-328.
- Price, D. A., Brenchley, J. M., Ruff, L. E., Betts, M. R., Hill, B. J., Roederer, M., Koup, R. A., Migueles, S. A., Gostick, E., Wooldridge, L., et al. (2005). Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. J. Exp. Med, 202, 1349-1361.

- Ramage, J. M., Metheringham, R., Conn, A., Spendlove, I., Moss, R. S., Patton, D. T., Murray, J. C., Rees, R. C., et Durrant, L. G. (2004). Identification of an HLA-A\*0201 cytotoxic T lymphocyte epitope specific to the endothelial antigen Tie-2. *Int. J. Cancer*, 110, 245-250.
- Reiser, J. B., Grégoire, C., Darnault, C., Mosser, T., Guimezanes, A., Schmitt-Verhulst, A. M., Fontecilla-Camps, J. C., Mazza, G., Malissen, B., et Housset, D. (2002). A T cell receptor CDR3beta loop undergoes conformational changes of unprecedented magnitude upon binding to a peptide/MHC class I complex. *Immunity*, 16, 345-354.
- Reiser, J. B., Legoux, F., Machillot, P., Debeaupuis, E., Le Moullac-Vaydie, B., Chouquet, A., Saulquin, X., Bonneville, M., et Housset, D. (2009). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic characterization of a public CMV-specific TCR in complex with its cognate antigen. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun*, 65, 1157-1161.
- Robinson, J., Waller, M. J., Fail, S. C., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P., et Marsh, S. G. E. (2009). The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research*, 37, D1013-D1017.
- Robinson, M. A. (1989). Allelic sequence variations in the hypervariable region of a T-cell receptor beta chain: correlation with restriction fragment length polymorphism in human families and populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **86**, 9422-9426.
- Rock, K. L., York, I. A., et Goldberg, A. L. (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol*, **5**, 670-677.
- Romero, P., Valmori, D., Pittet, M. J., Zippelius, A., Rimoldi, D., Lévy, F., Dutoit, V., Ayyoub, M., Rubio-Godoy, V., Michielin, O., et al. (2002). Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol. Rev*, **188**, 81-96.
- Rowen, L., Koop, B. F., et Hood, L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science*, **272**, 1755-1762.
- Rudensky, A. Y., Mazel, S. M., et Yurin, V. L. (1990). Presentation of endogenous immunoglobulin determinant to immunoglobulin-recognizing T cell clones by the thymic cells. *Eur. J. Immunol*, **20**, 2235-2239.
- Rudolph, M. G., Stanfield, R. L., et Wilson, I. A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol*, 24, 419-466.
- Rufer, N., Wolpert, E., Helg, C., Tiercy, J. M., Gratwohl, A., Chapuis, B., Jeannet, M., Goulmy, E., et Roosnek, E. (1998). HA-1 and the SMCY-derived peptide FIDSYICQV (H-Y) are immunodominant minor histocompatibility antigens after bone marrow transplantation. *Transplantation*, 66, 910-916.
- Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H. J., et von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science*, 266, 1208-1212.
- Salter, R. D., Benjamin, R. J., Wesley, P. K., Buxton, S. E., Garrett, T. P., Clayberger, C., Krensky, A. M., Norment, A. M., Littman, D. R., et Parham, P. (1990). A

binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature*, **345**, 41-46.

- Samelson, L. E., Harford, J., Schwartz, R. H., et Klausner, R. D. (1985). A 20-kDa protein associated with the murine T-cell antigen receptor is phosphorylated in response to activation by antigen or concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 82, 1969-1973.
- Sarafova, S. D., Erman, B., Yu, Q., Van Laethem, F., Guinter, T., Sharrow, S. O., Feigenbaum, L., Wildt, K. F., Ellmeier, W., et Singer, A. (2005). Modulation of coreceptor transcription during positive selection dictates lineage fate independently of TCR/coreceptor specificity. *Immunity*, 23, 75-87.
- Sarukhan, A., Garcia, C., Lanoue, A., et von Boehmer, H. (1998). Allelic inclusion of T cell receptor alpha genes poses an autoimmune hazard due to low-level expression of autospecific receptors. *Immunity*, 8, 563-570.
- Savage, P. A., Boniface, J. J., et Davis, M. M. (1999). A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity*, 10, 485-492.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., et Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, **59**, 1035-1048.
- Schumacher, T. N. et Ploegh, H. L. (1994). Are MHC-bound peptides a nuisance for positive selection? *Immunity*, **1**, 721-723.
- Schumacher, T. N. M. (2002). T-cell-receptor gene therapy. Nat. Rev. Immunol, 2, 512-519.
- Scott-Browne, J. P., White, J., Kappler, J. W., Gapin, L., et Marrack, P. (2009). Germline-encoded amino acids in the alphabeta T-cell receptor control thymic selection. *Nature*, **458**, 1043-1046.
- Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., et Ohashi, P. S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol*, **17**, 829-874.
- Shaw, A. S., Amrein, K. E., Hammond, C., Stern, D. F., Sefton, B. M., et Rose, J. K. (1989a). The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell*, **59**, 627-636.
- Shaw, A. S., Amrein, K. E., Hammond, C., Stern, D. F., Sefton, B. M., et Rose, J. K. (1989b). The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell*, **59**, 627-636.
- Singer, A. (2002). New perspectives on a developmental dilemma: the kinetic signaling model and the importance of signal duration for the CD4/CD8 lineage decision. *Curr. Opin. Immunol*, 14, 207-215.
- Singer, A. et Bosselut, R. (2004). CD4/CD8 coreceptors in thymocyte development, selection, and lineage commitment: analysis of the CD4/CD8 lineage decision. *Adv. Immunol*, 83, 91-131.
- Somasundaram, R., Robbins, P., Moonka, D., Loh, E., Marincola, F., Patel, A., Guerry, D., et Herlyn, D. (2000). CD4(+), HLA class I-restricted, cytolytic T-lymphocyte

clone against primary malignant melanoma cells. Int. J. Cancer, 85, 253-259.

- Speir, J. A., Garcia, K. C., Brunmark, A., Degano, M., Peterson, P. A., Teyton, L., et Wilson, I. A. (1998). Structural basis of 2C TCR allorecognition of H-2Ld peptide complexes. *Immunity*, 8, 553-562.
- Sprent, J. (1995). Central tolerance of T cells. Int. Rev. Immunol, 13, 95-105.
- Sprent, J. (1993). The thymus and T-cell tolerance. Ann. N. Y. Acad. Sci, 681, 5-15.
- Sprent, J. et Webb, S. R. (1987). Function and specificity of T cell subsets in the mouse. *Adv. Immunol*, **41**, 39-133.
- Sprent, J. et Webb, S. R. (1995). Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr. Opin. Immunol*, 7, 196-205.
- Starr, T. K., Jameson, S. C., et Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. Annu. Rev. Immunol, 21, 139-176.
- Stefanová, I., Dorfman, J. R., et Germain, R. N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature*, **420**, 429-434.
- Stewart-Jones, G. B. E., McMichael, A. J., Bell, J. I., Stuart, D. I., et Jones, E. Y. (2003). A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nat. Immunol*, 4, 657-663.
- Takahama, Y., Tanaka, K., et Murata, S. (2008). Modest cortex and promiscuous medulla for thymic repertoire formation. *Trends Immunol*, **29**, 251-255.
- Takeda, S., Rodewald, H. R., Arakawa, H., Bluethmann, H., et Shimizu, T. (1996). MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4+ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity*, **5**, 217-228.
- Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Pérarnau, B., Freitas, A. A., et Rocha, B. (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naïve or memory T cells. *Science*, 276, 2057-2062.
- **Tonegawa, S.** (1993). The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1987. Somatic generation of immune diversity. *Scand. J. Immunol*, **38**, 303-319.
- **Tourigny, M. R., Mazel, S., Burtrum, D. B., et Petrie, H. T.** (1997). T cell receptor (TCR)beta gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. *J. Exp. Med*, **185**, 1549-1556.
- Tourne, S., Miyazaki, T., Oxenius, A., Klein, L., Fehr, T., Kyewski, B., Benoist, C., et Mathis, D. (1997). Selection of a broad repertoire of CD4+ T cells in H-2Ma0/0 mice. *Immunity*, 7, 187-195.
- Trautmann, L., Labarrière, N., Jotereau, F., Karanikas, V., Gervois, N., Connerotte, T., Coulie, P., et Bonneville, M. (2002). Dominant TCR V alpha usage by virus and tumor-reactive T cells with wide affinity ranges for their specific antigens. *Eur. J. Immunol*, 32, 3181-3190.

- Trautmann, L., Rimbert, M., Echasserieau, K., Saulquin, X., Neveu, B., Dechanet, J., Cerundolo, V., et Bonneville, M. (2005). Selection of T cell clones expressing highaffinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. J. Immunol, 175, 6123-6132.
- Turka, L. A., Schatz, D. G., Oettinger, M. A., Chun, J. J., Gorka, C., Lee, K., McCormack, W. T., et Thompson, C. B. (1991). Thymocyte expression of RAG-1 and RAG-2: termination by T cell receptor cross-linking. *Science*, 253, 778-781.
- Turner, J. M., Brodsky, M. H., Irving, B. A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M., et Littman, D. R. (1990). Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell*, 60, 755-765.
- **Turner, S. J. et Carbone, F. R.** (1998). A dominant V beta bias in the CTL response after HSV-1 infection is determined by peptide residues predicted to also interact with the TCR beta-chain CDR3. *Mol. Immunol*, **35**, 307-316.
- Turner, S. J., Doherty, P. C., McCluskey, J., et Rossjohn, J. (2006). Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat. Rev. Immunol*, **6**, 883-894.
- Turner, S. J., Kedzierska, K., Komodromou, H., La Gruta, N. L., Dunstone, M. A., Webb, A. I., Webby, R., Walden, H., Xie, W., McCluskey, J., et al. (2005). Lack of prominent peptide-major histocompatibility complex features limits repertoire diversity in virus-specific CD8+ T cell populations. *Nat. Immunol*, 6, 382-389.
- Tynan, F. E., Borg, N. A., et al. (2005). High resolution structures of highly bulged viral epitopes bound to major histocompatibility complex class I. Implications for T-cell receptor engagement and T-cell immunodominance. *J. Biol. Chem*, **280**, 23900-23909.
- Tynan, F. E., Burrows, S. R., et al. (2005). T cell receptor recognition of a 'super-bulged' major histocompatibility complex class I-bound peptide. *Nat Immunol*, **6**, 1114-1122.
- Ueno, T. (2004). CCR7 Signals Are Essential for Cortex-Medulla Migration of Developing Thymocytes. *Journal of Experimental Medicine*, **200**, 493-505.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D. H. D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R. L., et Takahama, Y. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. J. Exp. Med, 200, 493-505.
- Van Laethem, F., Sarafova, S. D., Park, J., Tai, X., Pobezinsky, L., Guinter, T. I., Adoro, S., Adams, A., Sharrow, S. O., Feigenbaum, L., et al. (2007). Deletion of CD4 and CD8 coreceptors permits generation of alphabetaT cells that recognize antigens independently of the MHC. *Immunity*, 27, 735-750.
- Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., Samelson, L. E., et Bolen, J. B. (1989). Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature*, 338, 257-259.
- Veillette, A., Zúñiga-Pflücker, J. C., Bolen, J. B., et Kruisbeek, A. M. (1989). Engagement of CD4 and CD8 expressed on immature thymocytes induces activation of intracellular tyrosine phosphorylation pathways. J. Exp. Med, 170, 1671-1680.

- Venturi, V., Price, D. A., Douek, D. C., et Davenport, M. P. (2008). The molecular basis for public T-cell responses? *Nat. Rev. Immunol*, **8**, 231-238.
- Viken, M. K., Blomhoff, A., Olsson, M., Akselsen, H. E., Pociot, F., Nerup, J., Kockum, I., Cambon-Thomsen, A., Thorsby, E., Undlien, D. E., et al. (2009). Reproducible association with type 1 diabetes in the extended class I region of the major histocompatibility complex. *Genes Immun*, 10, 323-333.
- Wang, B., Primeau, T. M., Myers, N., Rohrs, H. W., Gross, M. L., Lybarger, L., Hansen, T. H., et Connolly, J. M. (2009). A single peptide-MHC complex positively selects a diverse and specific CD8 T cell repertoire. *Science*, 326, 871-874.
- Wang, J. et Reinherz, E. L. (2002). Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol. Immunol*, 38, 1039-1049.
- Weinreich, M. A. et Hogquist, K. A. (2008). Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J. Immunol*, **181**, 2265-2270.
- Werdelin, O., Cordes, U., et Jensen, T. (1998). Aberrant expression of tissue-specific proteins in the thymus: a hypothesis for the development of central tolerance. *Scand. J. Immunol*, 47, 95-100.
- Whitmire, J. K., Benning, N., et Whitton, J. L. (2006). Precursor frequency, nonlinear proliferation, and functional maturation of virus-specific CD4+ T cells. *J. Immunol*, 176, 3028-3036.
- Wiest, D. L., Yuan, L., Jefferson, J., Benveniste, P., Tsokos, M., Klausner, R. D., Glimcher, L. H., Samelson, L. E., et Singer, A. (1993). Regulation of T cell receptor expression in immature CD4+CD8+ thymocytes by p56lck tyrosine kinase: basis for differential signaling by CD4 and CD8 in immature thymocytes expressing both coreceptor molecules. J. Exp. Med, 178, 1701-1712.
- Wilson, A., Held, W., et MacDonald, H. R. (1994). Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J. Exp. Med*, **179**, 1355-1360.
- Wilson, A., Maréchal, C., et MacDonald, H. R. (2001). Biased V beta usage in immature thymocytes is independent of DJ beta proximity and pT alpha pairing. *J. Immunol*, 166, 51-57.
- Witt, C. M. et Robbins, K. (2005). Tracking thymocyte migration in situ. *Semin. Immunol*, 17, 421-430.
- Wright, J. A., Hood, L., et Concannon, P. (1991). Human T-cell receptor V alpha gene polymorphism. *Hum. Immunol*, **32**, 277-283.
- Wu, L. C., Tuot, D. S., Lyons, D. S., Garcia, K. C., et Davis, M. M. (2002). Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide–MHC. *Nature*, 418, 552-556.
- Wülfing, C., Sumen, C., Sjaastad, M. D., Wu, L. C., Dustin, M. L., et Davis, M. M. (2002). Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat. Immunol*, **3**, 42-47.

- Yachi, P. P., Ampudia, J., Gascoigne, N. R. J., et Zal, T. (2005). Nonstimulatory peptides contribute to antigen-induced CD8-T cell receptor interaction at the immunological synapse. *Nat. Immunol*, 6, 785-792.
- Yachi, P. P., Lotz, C., Ampudia, J., et Gascoigne, N. R. J. (2007). T cell activation enhancement by endogenous pMHC acts for both weak and strong agonists but varies with differentiation state. J. Exp. Med, 204, 2747-2757.
- Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Ogata, K., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Wiest, D. L., Tokunaga, M., et Saito, T. (2006). Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat. Immunol*, 7, 67-75.
- Yu, Q., Park, J., Doan, L. L., Erman, B., Feigenbaum, L., et Singer, A. (2006). Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. J. Exp. Med, 203, 165-175.
- Zal, T., Weiss, S., Mellor, A., et Stockinger, B. (1996). Expression of a second receptor rescues self-specific T cells from thymic deletion and allows activation of autoreactive effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 93, 9102-9107.
- Zerrahn, J., Held, W., et Raulet, D. H. (1997). The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell*, **88**, 627-636.

# **ANNEXES**

Gras S, Saulquin X, Reiser JB, Debeaupuis E, Echasserieau K, Kissenpfennig A, <u>Legoux F</u>, Chouquet A, Le Gorrec M, Machillot P, Neveu B, Thielens N, Malissen B, Bonneville M, Housset D.

Journal of Immunology, 2009 (183): 430-7

Les mécanismes conduisant à l'émergence de TCR publics restent mal compris, mais impliquent probablement de multiples paramètres, comme les biais de recombinaisons V(D)J, la sélection thymique, l'homéostasie périphérique, et la sélection dépendante de l'antigène (Venturi et al., 2008). Même si la contribution relative de ces paramètres est délicate à évaluer, ce dernier facteur est sans doute décisif dans la dominance des TCR publics impliqués dans la réponse pp65/A2-spécifique. En effet, le répertoire des individus sujets à des réactivations plus fréquentes du HCMV est plus restreint que celui des donneurs sains. Cette focalisation du répertoire s'accompagne d'un enrichissement en TCR publics de forte affinité, présentant des CDR1 et 2 récurrents et des séquences de CDR3 conservées (Trautmann et al., 2005). Parmi les TCR publics, les plus fréquents portent les segments géniques TRAV24-TRAJ49 et TRBV6-5, et représentent la grande majorité des cellules T pp65/A2-spécifiques chez la moitié des patients immunodéprimés. Cela suggère que ces clones sont favorisés au cours des stimulations antigéniques chroniques, et expriment donc des combinaisons de CDR optimales pour la reconnaissance du pCMH, l'activation subséquente, la différentiation et la prolifération en périphérie.

Dans cette étude, nous avons investigué le rôle de la structure de l'antigène dans la génération du biais public dans le répertoire T CD8 dirigé pp65/A2. L'étude structurale d'un complexe TCR public (nommé RA14) / pCMH, associée à des analyses fonctionnelles, nous ont permis d'identifier les résidus clefs impliqués dans la reconnaissance de l'antigène par le TCR. En accord avec l'hypothèse d'un mode de reconnaissance conservé, ces motifs d'interaction du paratope sont partagés par la plupart des TCR publics du répertoire étudié. Nos résultats permettent ainsi d'établir les bases structurales de la récurrence observée dans le répertoire T dirigé contre cet épitope, et suggèrent que les contacts optimaux identifiés dans l'interaction du TCR public avec le pCMH constituent effectivement le principal moteur de la focalisation du répertoire T CD8 observée au cours des stimulations antigéniques chroniques par le cytomégalovirus.

J'ai contribué à ce travail en vérifiant, sur le plan fonctionnel, les hotspots de l'interaction TCR-pCMH définis par l'analyse structurale. Le clone T RA14 était capable de lyser *in vitro* des cellules cibles chargées avec le peptide sauvage, mais pas chargées avec des peptides variants au niveau des positions contactées par le TCR. D'autre part, les autres clonotypes publics pp65/A2-spécifiques étaient également affectés fonctionnellement par les mutation peptidiques, suggérant un mode de docking similaire au TCR RA14.

# Structural Bases for the Affinity-Driven Selection of a Public TCR against a Dominant Human Cytomegalovirus Epitope<sup>1</sup>

Stéphanie Gras,<sup>2,3</sup>\* Xavier Saulquin,<sup>2†</sup> Jean-Baptiste Reiser,\* Emilie Debeaupuis,<sup>†</sup> Klara Echasserieau,<sup>†</sup> Adrien Kissenpfennig,<sup>4‡</sup> François Legoux,<sup>†</sup> Anne Chouquet,\* Madalen Le Gorrec,\* Paul Machillot,\* Bérangère Neveu,<sup>†</sup> Nicole Thielens,\* Bernard Malissen,<sup>‡</sup> Marc Bonneville,<sup>5†</sup> and Dominique Housset<sup>5</sup>\*

Protective T cell responses elicited along chronic human CMV (HCMV) infections are sometimes dominated by CD8 T cell clones bearing highly related or identical public TCR in unrelated individuals. To understand the principles that guide emergence of these public T cell responses, we have performed structural, biophysical, and functional analyses of an immunodominant public TCR (RA14) directed against a major HLA-A\*0201-restricted HCMV Ag (pp65<sub>495-503</sub>) and selected in vivo from a diverse repertoire after chronic stimulations. Unlike the two immunodominant public TCRs crystallized so far, which focused on one peptide hotspot, the HCMV-specific RA14 TCR interacts with the full array of available peptide residues. The conservation of some peptide-MHC complex-contacting amino acids by lower-affinity TCRs suggests a shared TCR-peptide-MHC complex docking mode and supports an Ag-driven selection of optimal TCRs. Therefore, the emergence of a public TCR of an oligoclonal Ag-specific response after repeated viral stimulations is based on a receptor displaying a high structural complementarity with the entire peptide and focusing on three peptide hotspots. This highlights key parameters underlying the selection of a protective T cell response against HCMV infection, which remains a major health issue in patients undergoing bone marrow transplantation. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 430–437.

H uman CMV (HCMV)<sup>6</sup> is a ubiquitous β-herpesvirus that infects 60–90% of the population. After primary infection, HCMV persists in a latent stage and can undergo transient reactivations. Although HCMV infections or reactivations are usually kept in check by the immune system of immunocompetent individuals, they can cause life-threatening diseases in immunocompromised patients (1). CD8<sup>+</sup> CTLs have a central

Received for publication February 18, 2009. Accepted for publication April 29, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This study was supported in part by the Agence Nationale de la Recherche (Grant ANR-05-MIIM-019). B.M. and M.B. were also supported by the EPI-PEPVAC European Union Grant. The authors have declared that no competing interests exist.

<sup>2</sup> S.G. and X.S. equally contributed to the work.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

role in controlling HCMV reactivation (2-6). Although CD8<sup>+</sup> T cells specific for the immediate early gene product IE-1 are found at substantial frequencies in some donors (7, 8), the predominant CTL response is directed against the viral tegument protein pp65 (5, 9). In individuals sharing the widespread HLA-A\*0201 allele (referred to as A2), HCMV-specific CTLs recognize the same epitope pp65495-503 (NLVPMVATV), hereafter referred to as NLV (5, 10, 11). Albeit polyclonal, the NLV-specific CTL response in healthy donors is usually made of a limited number of peptide-specific CTL clones expressing a restricted set of TCR $\beta$ variable gene segments that may differ from one individual to another (5, 11, 12). However, a further dramatic reduction of clonal diversity occurs during chronic inflammation (e.g., in rheumatoid arthritis patients) and immunodepression, resulting in the selection of a few dominant clones bearing high-affinity TCRs (13). Because immunodepressed patients are prone to HCMV reactivation, this clonal focusing presumably reflects favored expansion of the bestfit clonotypes along recurrent antigenic stimulations. NLV-specific TCRs that predominate in the latter patients carry several public features (i.e., shared by clonotypes from different individuals), such as restricted V $\alpha$  or V $\beta$  usage and conserved motifs within the CDR3 loops (13). These public TCRs can be expressed by up to 15% of peripheral blood CD8 T cells of patients undergoing HCMV reactivation, highlighting their major contribution to the NLV-specific response. Recent structural analysis of public TCRs in complex with peptide-MHC (pMHC) revealed unique structural features of the selecting pMHC complex, such as limited solvent accessibility or marked bulging of one peptide residue, that accounts for selection of an homogeneous repertoire (14, 15). However, it remains unclear whether similar rules apply to public T cell responses selected after repeated stimulation, as observed in HCMV infection. To gain insight into the mechanisms underlying clonal focusing along chronic Ag stimulation, we have determined the crystal structure of the immunodominant NLV peptide bound

<sup>\*</sup>Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Unité mixte de recherche 5075 (CEA, CNRS, UJF, PSB), Grenoble, France; <sup>†</sup>INSERM, Unité 892, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, Nantes, France; and <sup>‡</sup>Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerrannée, INSERM, Unité 631, CNRS, Marseille, France

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Current address: The Protein Crystallography Unit, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Biomedical Sciences, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Current address: Infection and Immunity Division, Centre for Cancer Research and Cell Biology, School of Biomedical Sciences, Queens University, Belfast, Northern Ireland.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Marc Bonneville, INSERM, Unité 892, Institut de Recherche Thérapeutique, 9 quai Moncousu, Université de Nantes, F-44035 Nantes, France. E-mail address: bonnevil@nantes.inserm.fr, or Dominique Housset, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Unité mixte de recherche 5075 (CEA, CNRS, UJF, PSB), 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble, France. E-mail address: dominique.housset@ibs.fr

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Abbreviations used in this paper: HCMV, human CMV; A2, HLA-A\*0201 allele; FLR, FLRGRAYGL; NLV, NLVPMVATV; PEG, polyethylene glycol; pMHC, peptide-MHC; pMHCI, pMHC class I; RA14-NLV-A2, RA14 TCR-NLV-A2 complex; SPR, surface plasmon resonance; TAP, transporter associated with Ag processing.

to A2 in isolation or in complex with a dominant public TCR (RA14) derived from an immunodepressed patient (13). These structural data, combined with biophysical and functional experiments, allowed us to determine a new and quite extensive peptide readout mode with three peptide hot spots sensed by the RA14 TCR. It also provided a possible mechanism underlying preferred usage of some TRAV, TRBV, CDR3 $\alpha$ , and CDR3 $\beta$  for the recognition of this immunodominant peptide in an immunodepressed context associated with HCMV reactivation, as is the case for patients with oncohematological diseases undergoing bone marrow transplantation.

#### **Materials and Methods**

#### Plasmid construction

The cDNA encoding the full-length  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains were cloned into pGEM-T Easy (Promega). The sequence encoding the V and C ectodomain of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain were then amplified by PCR using the following primers: 5' sense primers (5'-ggaattccaggaggagtttaaaatggtacatgaacgtagagacaaagtcc) or (5'-ggaattccaggaggagatttaaaatggtaccacaaattcc) containing an *EcoRI* restriction site (underlined) and a strong consensus Shine Dalgarno sequence (bold) around the initiation codon to promote optimal translation of the  $\alpha$ -chain and  $\beta$ -chain respectively, and 5' anti-sense primers (5'-gctctagattcacaccaccacctgtcgtttctggctgggagaagagtgtcttctgg-3') or (5'-gctctagagcctagtcacaaccaccaccctgtcgtgctgctcaccaccagcctg-3') containing an *XbaI* restriction site and encoding for C $\alpha$ - and  $\beta$ -terminal constant domain extension (NDGGCK) and (QDRGGGCD\*) (14). PCR products were cloned into the pLM1 vector in frame with a C-terminal biotin acceptor peptide sequence tag for the  $\alpha$ -chain and into pET22b (Novagen) for the  $\beta$ -chain.

#### Protein expression and purification of R14 TCR

Both RA14  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains were produced separately as inclusion bodies in BL21(DE3)RIL *Escherichia coli* strain (Stratagene), transformed by either pLM1- $\alpha$  or pET22b- $\beta$  plasmids. Inclusion bodies were resuspended in 8 M urea, 50 mM MES (pH 6.5), 0.1 mM DTT, and 0.1 mM EDTA. Equal quantity of both chains were then mixed in 6 M guanidine HCl, 50 mM MES (pH 6.5), 10 mM EDTA, 2 mM DTT, and 1 mM sodium acetate. RA14 TCR was refolded by flash dilution in a solution containing 3 M urea, 200 mM arginine HCl, 150 mM Tris (pH 8), 1.5 mM reduced glutathione, and 0.15 mM oxidized glutathione at 4°C. After an incubation of 72 h at 4°C, the folding solution was dialyzed against 10 mM Tris (pH 8.5) and 50 mM NaCl for 24 h and against 10 mM Tris (pH 8.5) for 48 h. The resulting protein solution was then concentrated using a 10 kDa membrane (Millipore) and purified on a MonoQ 5/50 (GE Healthcare) column with a fast protein liquid chromatography system (Purifier 10, GE Healthcare). The elution was performed with a 0–0.5 M NaCl gradient.

#### Protein expression and purification of NLV-HLA-A2

Both HLA-A\*0201 heavy chains and \(\beta2\)-microglobulin were produced separately as previously described (16, 17). In brief, the A245V mutant of the HLA-A\*0201 H chain tagged at the C-ter with a biotinylation sequence was cloned into pHN1 expression vector as described in (17). Recombinant proteins were produced as inclusion bodies in XA90F'LaqQ1 Escherichia coli strain. The inclusion bodies were resuspended in 8 M urea, 50 mM MES (pH 6.5), 0.1 mM DTT, and 0.1 mM EDTA, incubated overnight at 4°C, and centrifuged 30 min at 100,000 g. The supernatant was collected and frozen at  $-80^{\circ}$ C. The pMHC complex refolding step was done by flash dilution of a mix of 21 mg HLA-A\*0201, 10 mg B2-microglobulin, and 10 mg of the desired synthetic peptide into 350 ml of 100 mM Tris (pH 8.0), 400 mM L-Arginine HCl, 2 mM EDTA, 5 mM reduced glutathione, 0.5 mM oxidized glutathione, and two Complete EDTA-free Cocktail Inhibitor Tablets (Roche). The refolding solution was then incubated for 4 to 5 days at 4°C and concentrated with a 10 or 30 kDa cutoff membrane (Vivacell System; Vivascience). The pMHC complex was purified on a MonoQ 5/50 column with a fast protein liquid chromatography system equilibrated in a 10 mM Tris (pH 8.0) buffer. It was eluted with 100 to 150 mM NaCl and concentrated with Amicon-10 or Amicon-30 devices to reach a final protein concentration of 2.5 to 3.5 mg/ml.

#### Surface plasmon resonance (SPR) experiments

Binding of HLA-A\*0201 loaded with the different NLV peptide variants to TCR RA14 was analyzed by SPR. All experiments were performed using a Biacore 3000 instrument (GE Healthcare) at 25°C in HBS-EP buffer (10

Table I. Affinity of RA14 TCR for NLV variants and functional impact on cytotoxic response of the RA14 T cell clone<sup>a</sup>

	Sequence	$K_{\rm D}~(\mu{\rm M})$	EC <sub>50</sub> (nM)
NLV	NLVPMVATV	$27.7 \pm 2.3$	$5.10^{-2} \pm 0.01$
P4G	NLVGMVATV	$69.2 \pm 1.5$	$50 \pm 3$
P4A	NLVAMVATV	$56.5 \pm 4.0$	$5.10^{-1} \pm 0.1$
M5S	NLVPSVATV	n.d.	$5.10^{2} \pm 20$
M5V	NLVPVVATV	$60.2 \pm 2.6$	$5.10^{2} \pm 50$
M5T	NLVPTVATV	$58.2 \pm 1.7$	$10^{3} \pm 30$
M5Q	NLVPQVATV	$57.5 \pm 1.3$	$10^{2} \pm 20$
T8A	NLVPMVAAV	n.d.	$>10^{4}$
T8S	NLVPMVA <u>S</u> V	$42.7 \pm 8.4$	$10^{-1} \pm 0.05$
T8V	NLVPMVA <u>V</u> V	n.d.	$> 10^{4}$

<sup>*a*</sup> Dissociation constants ( $K_D$ ) were determined by steady-state SPR experiments for the interaction between RA14 TCR and HLA-A\*0201 loaded with either the native viral NLV peptide or one of the nine different peptide variants (the mutated amino acids are underlined). The ability of a T cell clone bearing the RA14 TCR to recognize HLA-A\*0201-positive target cells loaded with each peptide variant was evaluated by determining the peptide concentration necessary to achieve half maximal target-cell lysis (EC<sub>50</sub> at an effector to target ratio of 10:1).

n.d., No binding detected.

mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20). RA14 TCR was diluted to 20 µg/ml in 10 mM acetate buffer (pH 5.0) and coupled at 3300-6000 resonance units onto three adjacent cells of a CM5 sensor chip (GE Healthcare) by classical amine coupling at a flow rate of 5  $\mu$ l/ min. The blank cell was made by ethanolamine deactivation of the activated surface. Before SPR experiments, HLA-A\*0201-peptide complexes were dialysed against 10 mM Tris (pH 8) containing 150 mM NaCl and a final step of purification by gel-filtration on a Superdex-200 column (GE Healthcare) was performed to eliminate aggregates. HLA-A\*0201-peptide complexes were injected onto the four flow cells simultaneously at various concentrations ranging from 0.31 to 80  $\mu$ M. SPR data were analyzed using the steady state affinity model of the BIAevaluation 3.1 software. Analysis of the steady-state data was then performed by averaging the equilibrium response over the final 10 to 25 s of each injection, plotting the equilibrium response against concentration, and fitting using a 1:1 binding model (supplemental Fig. S1).<sup>7</sup> Final affinity constants were obtained by averaging values fitted over the triplicate data sets and all errors reported are SD from the mean (Table I).

#### T cell clones and functional assays

T cell clones directed against NLV-HLA-A\*0201 were obtained and cultured as previously described (13). The NLV and NLV variant synthetic peptides were dissolved at 20 mg/ml in DMSO, diluted at 2 mg/ml in 10 mM acetic acid, and then diluted to the required concentration in RPMI 1640 10% FCS. Cytotoxicity was measured in a standard 4 h <sup>51</sup>CR assay (18). Briefly, transporter associated with Ag processing (TAP)-deficient HLA-A\*0201-positive T2 cells were labeled with 100  $\mu$ Ci of Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CRO<sub>4</sub> for 1 h at 37°C, washed three times in RPMI 1640 10% FCS, and pulsed with various concentrations of NLV peptides for 1 h at 37°C. After two washes, target cells were incubated with the different T cell clones at an effector:target ratio of 10:1 in 100 µl of RPMI 1640 10% FCS for 4 h at 37°C. Supernatant (25 µl) from each well was removed and counted in a gamma scintillation counter. Peptide concentrations necessary to achieve half-maximal target-cell lysis (EC50) were calculated from three independent experiments and errors reported correspond to SD from the mean EC50 values (Table I).

#### Crystallographic data collection

Crystals were grown by vapor diffusion with the hanging drop technique at 293K. The crystals of the NLV-A2 and the NLV<sub>variants</sub>-A2 complexes were obtained by mixing 2  $\mu$ l of 3–5 mg/ml protein solution and 2  $\mu$ l of the reservoir solution (9–20% polyethylene glycol (PEG) 6000, 0.1 M tri-Na Citrate (pH 6.5), 0–0.1 M NaCl). Before crystallization, the RA14-TCR-NLV-A2 complex was formed by mixing TCR and pMHC with a molar ratio of 1:1 and at a final concentration of 2 mg/ml for the complex. The crystals were grown in 18–24% PEG 3350, 0.3 M LiSO<sub>4</sub>. The crystals were collected with 30% of either glycerol or PEG added to the mother liquor before flash freezing. All data were collected at 100 K. The

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> The online version of this article contains supplemental material.



**FIGURE 1.** Overall view of RA14-NLV-A2 complex structure. *A*, Ribbon representation of the RA14-NLV-A2 ternary complex. TCR $\alpha$ - and  $\beta$ -chains are depicted in light gray and medium gray, respectively. CDR1 $\alpha$ , CDR2 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$ , CDR3 $\beta$ , CDR2 $\beta$ , and CDR3 $\beta$  are shown in green, red, blue, chartreuse green, orange, and cyan, respectively. HLA-A2 is depicted in gold and silver mauve for the  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 domains, respectively, and gray for the  $\alpha$ 3 and  $\beta$ 2-microglobulin domains. The peptide is shown in purple balls and sticks. *B* and *C*, Two perpendicular enlarged views of the RA14-NLV-A2 interface. *D*, Footprint of the RA14 TCR on the molecular surface of the NLV-A2 complex. NLV-A2 molecular surface buried by the RA14 CDRs has been colored as in *A*. *E*, Superposition of the NLV-A2 (depicted in gray) and RA14-NLV-A2 (depicted as in *A*) complex structures.

data sets for the NLV-A2 and NLV<sub>variants</sub>-A2 crystals were collected on beamlines ID14-eh2 and ID23-eh2 of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) at a wavelength of 0.933 Å using an ADSC Q4 CCD detector. The data set of the RA14-NLV-HLA-A2 crystal was collected on beamline ID29 of the ESRF at a wavelength of 0.976 Å using an ADSC Q315 CCD detector. Data processing was performed using XDS (19) and summarized in Table S1.

#### Structure determination and refinement

All structures were solved by molecular replacement with AMoRe (20). The NLV-A2 structure was solved using the GVYDGREHTV-A2 structure (Protein Data Bank (PDB) entry 1I4F, (21)) as the initial model. For the NLV<sub>variants</sub>-A2 structures, the NLV-A2 structure was used as starting model. The RA14 TCR-NLV-A2 complex (hereafter denoted RA14-NLV-A2) structure was solved using the NLV-A2 binary complex structure and PDB entry 2BNU (22) as pMHC and TCR initial models. All structures include one complex per asymmetric unit and the refinement protocol used included several cycles of refinement with REFMAC (23) followed by manual model rebuilding with O (24) and Coot (25), until no interpretable electron density could be identified in the residual map. The electron density is well defined for the whole NLV-A2 and NLV<sub>variants</sub>-A2 binary complexes. However, some peptide side chains showed significant mobility. For instance, the Met5<sup>P</sup> side chain has a weak electron density beyond its  $C\beta$  atom, and Met5<sup>P</sup>, Val6<sup>P</sup>, and Thr8<sup>P</sup> side chains have been modeled with two discrete conformations, indicating a significant mobility for the most solvent-exposed side chains as well as for the Val6<sup>P</sup> in the A2 C pocket (Fig. S2). The whole RA14-NLV-A2 complex structure is well defined in the electron density map (Fig. S3) except for two stretches of the TCR C $\alpha$ domain corresponding to residues 143-150 and 160-169. Final refinement statistics and PDB entry are summarized in Table S1. Coordinates for RA14-NLV-A2, NLV-A2, NLV<sub>M5S</sub>-A2, NLV<sub>M5V</sub>-A2, NLV<sub>M5T</sub>-A2, NLV<sub>M50</sub>-A2, NLV<sub>T8A</sub>-A2, and NLV<sub>T8V</sub>-A2 structures were deposited with the PDB (http://www.rcsb.org/pdb) under 3GSN, 3GSO, 3GSQ, 3GSR, 3GSU, 3GSV, 3GSW, and 3GSX accession numbers, respectively.

#### Results

#### Structural overview of the NLV-A2 and TCR-NLV-A2 complexes

The crystal structure of the NLV-A2 binary complex has been determined at 1.6 Å resolution. NLV carries the canonical A2 binding motif (Leu in P2, Val in P6, and Leu in P9, (26)) and the most solvent-exposed residues are found at positions 4, 5, and 8.

The crystal structure of RA14-NLV-A2 has been refined to 2.8 Å resolution (Fig. 1A). The RA14 TCR is encoded by rearranged TRAV24 and TRAJ49 gene segments for the  $\alpha$ -chain and TRBV6-5, TRBD1, and TRBJ1-2 gene segments for the  $\beta$ -chain (27). The RA14 TCR docking orientation on NLV-A2 (35°) falls within the range of orientations already observed for other TCRs in complex with pMHC class I (pMHCI) (28), and reflects the generally adopted diagonal docking mode. As illustrated by the TCR footprint on the pMHC surface (Fig. 1D), the CDR1 $\alpha$  and CDR3 $\alpha$ loops interact with the N-terminal half of the peptide and the  $\alpha 1$ MHC helix, whereas the CDR1 $\beta$  and CDR3 $\beta$  loops primarily contact the C-terminal end of the peptide and the  $\alpha 2 \text{ A} 2$  helix. CDR2 $\alpha$ and CDR2 $\beta$  exclusively contact the  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 1 A2 helices, respectively. When docking onto the NLV-A2 complex, RA14 buries 91% (324  $Å^2$ ) of the peptide solvent accessible surface while in other TCR-pMHCI complex structures known to date, this percentage varies from 60 to 89%. Only 32 Å<sup>2</sup> of the peptide surface is left exposed to the solvent. Therefore, while the RA14-NLV-A2 complex adopts the canonical TCR diagonal docking mode, it manages to form the most extensive peptide covering among the TCR-pMHCI structures known to date.

## The TCR-A2 interface highlights a new TRAV6-5-A2 binding mode

The RA14-A2 interaction is mediated by six hydrogen bonds and 43 van der Waals contacts (Table II) and involves all CDRs except CDR2 $\alpha$ . RA14 sits on A2  $\alpha$ 1 helix through a hydrophobic cluster between the CDR2 $\beta$  (Val50<sup> $\beta$ </sup>, Ile54<sup> $\beta$ </sup>) on one side and the aliphatic chain of Gln72<sup>H</sup>, Arg75<sup>H</sup> and Val76<sup>H</sup>, on the other, as well as through two hydrogen bonds between the framework residues Tyr48<sup> $\beta$ </sup> hydroxyl group and Asp56<sup> $\beta$ </sup> Oδ1 atom and the Gln72<sup>H</sup> N $\varepsilon$ 2 atom (Fig. 2*A*). This anchor is complemented with two hydrogen bonds between the tip of RA14 CDR3 $\alpha$  (Asn96<sup> $\alpha$ </sup> amine group) and both Gln72<sup>H</sup> O $\varepsilon$ 1 atom and Ala69<sup>H</sup> carbonyl group (Fig. 2*B*). Gln72<sup>H</sup> is therefore truly identified as a tight anchor for

TCR RA14: HLA-A2 van der Waals Contacts (C-C $< 4.5$ Å)						
CDR	Gene segment	TCR contact residues	HLA contact residues	No. of contacts		
CDR1a	TRAV24	Asn29	Lys66	2		
$CDR1\alpha$	TRAV24	Tyr31	Gln155	5		
$CDR2\alpha$	TRAV24	Thr51	Gln155	2		
$CDR2\alpha$	TRAV24	Leu52	Ala158	1		
$CDR3\alpha$	TRAJ49	Thr94	Arg65	3		
$CDR3\alpha$	TRAJ49	Gly95	Ala69	2		
$CDR3\alpha$	TRAJ49	Asn96	Ala69	4		
FW	TRBV6-5	Tyr48	Gln72	2		
CDR2B	TRBV6-5	Val50	Gln72	1		
$CDR2\beta$	TRBV6-5	Val50	Val76	2		
$CDR2\beta$	TRBV6-5	Ile54	Arg75	7		
$CDR2\beta$	TRBV6-5	Ile54	Val76	1		
CDR3B	N-TRBD1-N	Val96	Lys146	4		
$CDR3\beta$	N-TRBD1-N	Ile100	Gln155	3		
CDR3B	TRBJ1-2	Tvr101	Ala149	1		
CDR36	TRBJ1-2	Tyr101	Ala150	3		

Table II. TCR-peptide and TCR-MHC interactions<sup>a</sup>

TCR RA14: HLA-A2 Hydrogen Bonds

CDR	Segment	TCR contact atom		HLA contact atom		Length (Å)
CDR3a	TRAJ49	Asn96	ND2	Ala69	0	2.83
$CDR3\alpha$	TRAJ49	Asn96	ND2	Gln72	OE1	2.70
$CDR1\beta$	TRBV6-5	Glu30	OE2	Lys146	NZ	3.23
FW	TRBV6-5	Tyr48	OH	Gln72	NE2	2.67
FW	TRBV6-5	Asp56	OD1	Gln72	NE2	2.85
$CDR3\beta$	TRBJ1-2	Tyr101	OH	Ala149	0	3.11

TCR RA14: NLV van der Waals Contacts (C-C < 4.5 Å)

CDR	Segment TC		R contact residues Peptide c		ide contact residues		icts
CDR1a	TRAJ49	Asn29		Pro4	Pro4		
$CDR1\alpha$	TRAJ49	Phe30		Pro4	Pro4		
$CDR1\alpha$	TRAJ49	Ту	r31	Val3	Val3		
$CDR1\alpha$	TRAJ49	Ту	r31	Pro4	Pro4		
$CDR1\alpha$	TRAJ49	Ту	r31	Met5	Met5		
$CDR3\alpha$	TRAJ49	GÌ	y95	Met5	Met5		
$CDR1\beta$	TRBV6-5	Gl	u30	Thr8		1	
$CDR3\beta$	N-TRBD1-N	Th	r97	Ala7	Ala7		
$CDR3\beta$	N-TRBD1-N	Th	r97	Thr8	Thr8		
$CDR3\beta$	N-TRBD1-N	Gl	y98	Met5	Met5		
$CDR3\beta$	N-TRBD1-N	Gl	y98	Val6	Val6		
$CDR3\beta$	N-TRBD1-N	Gl	y98	Ala7	Ala7		
$CDR3\beta$	N-TRBD1-N	Gly99		Met5	Met5		
$CDR3\beta$	N-TRBD1-N	Gly99		Ala7	Ala7		
CDR3β	N-TRBD1-N	Ile100		Met5	Met5		
TCR RA14: NLV Hydrogen Bonds							
CDR	Segment	TCR contact atom		Peptide con	Peptide contact atom		(Å)
CDR3a	TRAJ49	Asn96	NH	Met5	SD	3.61	
$CDR1\beta$	TRBV6-5	Glu30	OE1	Thr8	OH	2.74	
$CDR3\beta$	N-TRBD1	Thr97	0	Thr8	Ν	3.09	
$CDR3\beta$	N-TRBD1	Thr97	0	Thr8	OH	2.92	
$CDR3\beta$	N-TRBD1	Thr97	NH	Thr8	OH	3.44	

<sup>a</sup> FW, Frame work residues.

RA14, thanks to TRAJ49-TRB6-5 combination. The particular focusing of Tyr48<sup> $\beta$ </sup> and Asp56<sup> $\beta$ </sup> on the Gln72<sup>H</sup> is unique to RA14-NLV-A2 and differs from that highlighted in several other TCRpMHC structures in which these two well conserved residues preferentially interact with Arg65<sup>H</sup> (29). RA14 contacts A2  $\alpha$ 2 helix mainly through its CDR1 $\alpha$ , CDR1 $\beta$  and CDR3 $\beta$ . Tyr31<sup> $\alpha$ </sup> side chain is sandwiched by A2 Gln155<sup>H</sup> and peptide Pro4<sup>P</sup> and Met5<sup>P</sup>, while its main chain carbonyl group further stabilizes the Gln155<sup>H</sup> side chain through an elongated hydrogen bond (3.86 Å, Fig. 2*C*). Such an interaction is reminiscent of that observed for Tyr31<sup> $\alpha$ </sup> in 1G4 TCR-NY-ESO-1-A2 complex (22), but differs from the one identified by Marrack et al. (29) as a commonly used V $\alpha$ /MHC contact and involving a tyrosine at position 32<sup> $\alpha$ </sup> (numbered as Tyr31<sup> $\alpha$ </sup> (29)) and position 155<sup>H</sup> on the  $\alpha$ 2 MHC helix. CDR1 $\beta$  and CDR3 $\beta$  are involved through an ionic interaction between Glu30<sup> $\beta$ </sup> and Lys146<sup>H</sup> side chains (Fig. 2*D*) and one hydrogen bond between Tyr101<sup> $\beta$ </sup> hydroxyl group and Ala149<sup>H</sup> carbonyl oxygen atom and a few van der Waals contacts. Remarkably,

F30



С

**FIGURE 2.** Detailed views of the RA14-NLV-A2 interaction hot spots. *A*, Interaction of the RA14 CDR2 $\beta$  with the A2  $\alpha$ 1 helix. *B*, Interaction of the RA14 CDR1 $\alpha$  (Asn96 $^{\alpha}$ ) with the NLV-A2. *C*, Interaction of the CDR1 $\alpha$  (Tyr31 $^{\alpha}$ ) with the NLV-A2 complex. *D*, Interaction of the CDR1 $\beta$  with NLV-A2.

although RA14 TCR shares with A6, B7, and 1G4 TCRs the same TRBV6-5 segment, its binding mode to A2 differs and constitutes a new structural codon for the TRBV6-5-A2 interaction as defined by Feng et al. (30) likely favored by the presence of the TRAJ49 encoded Asn96<sup> $\alpha$ </sup>. This reinforces the concept that a V $\beta$  (or V $\alpha$ ) domain encoded by given TRBV (or TRAV) segment can adopt several different binding modes with the same MHC molecule, depending on the other segments used to encode the whole TCR.

Α

#### A TCR-pMHC complex with a nearly maximal peptide readout

Overall, the NLV peptide establishes five hydrogen bonds and 48 van der Waals contacts with RA14 (Table II). RA14 contacts the peptide at nearly all solvent-exposed positions, namely 3, 4, 5, 6, 7, and 8, but  $\sim 80\%$  of the van der Waals contacts focus on positions 4 and 5, while the hydrogen bonds essentially engage Thr8<sup>P</sup>. The bulging  $Pro4^{P}$  and  $Met5^{P}$  fit a cavity formed by  $CDR1\alpha$ , CDR3 $\alpha$ , and CDR3 $\beta$  (Fig. 2C). Pro4<sup>P</sup> is sandwiched between Asn $29^{\alpha}$  and Tyr $31^{\alpha}$  side chains and establishes hydrophobic contacts with them (Fig. 2C). The tips of the CDR3 $\alpha$  (Asn93 $^{\alpha}$ , Gly95<sup> $\alpha$ </sup>, Asn96<sup> $\alpha$ </sup>) and CDR3 $\beta$  (Gly98<sup> $\beta$ </sup>, Gly99<sup> $\beta$ </sup>) loops and the Tyr31<sup> $\alpha$ </sup> aromatic ring form a molecular cage for the Met5<sup>P</sup> side chain and thus fully stabilize it. The Met5<sup>P</sup> sulfur atom is further stabilized by a 3.61 Å long hydrogen bond with the Asn96<sup> $\alpha$ </sup> NH group (Table II, Fig. 2B). Contrasting with the hydrophobic nature of the TCR-peptide interactions involving positions 4 and 5, a dense network of hydrogen bonds connects Thr8<sup>P</sup> with the side chain of Glu30<sup> $\beta$ </sup> and the main chain of Thr97<sup> $\beta$ </sup> (Table II). The Glu $30^{\beta}$  side chain is further stabilized through two hydrogen bonds with Thr97<sup> $\beta$ </sup> N and Lys146<sup>H</sup> N $\zeta$  (Fig. 2D). Importantly, the CDR3 $\beta$  contribution to the TCR-peptide interface is essentially mediated through its main chain. The only CDR3ß sequence requirement seems to be the glycine at position  $98\beta$ , consistent with the van der Waals contacts established between the C $\alpha$  atom and position 5, 6, and 7 of the peptide. Overall, although all the significantly solvent-exposed peptide residues contribute to the interface with the TCR, the present structural data identify Pro4<sup>P</sup>, Met5<sup>P</sup>, and Thr8<sup>P</sup> as main peptide recognition spots.

Minor pMHC structural changes induced upon TCR binding

The structure of the NLV-A2 alone or in complex with RA14 are similar, the root mean square difference on  $C\alpha$  atom pairs being 0.51 Å for the  $\alpha 1 \alpha 2$  A2 domain and 0.53 Å for the peptide (Fig. 1*E*). Upon TCR binding, a 1 Å shift of Pro4<sup>P</sup> and Met5<sup>P</sup> backbone toward the  $\alpha 1$  A2 helix is observed and correlates with both the insertion of Tyr31<sup> $\alpha$ </sup> between the peptide and the A2  $\alpha$ 2 helix and the clamping of Met5<sup>P</sup> by CDR1 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$ , and CDR3 $\beta$ . Moreover, TCR docking onto pMHC clearly affects the mobility of Met5<sup>P</sup> and Thr8<sup>P</sup>, as shown by the electron density, as the side chains of both residues adopt a unique and well-defined conformation and interact with RA14 CDRs (Fig. S3). Among the 24 A2 residues implicated in the RA14-NLV-A2 interface, eight of them have their side chain conformation altered by the docking of RA14. These changes were mainly caused by steric hindrance generated by the TCR (Glu58<sup>H</sup>, Arg65<sup>H</sup>, Arg75<sup>H</sup>, Gln155<sup>H</sup>), by favorable interactions with the TCR (Gln72<sup>H</sup>, Gln155<sup>H</sup>), or by concerted movement with one of the latter residues (Glu19<sup>H</sup>, Asp61<sup>H</sup>,  $Glu154^{H}$ ).

## RA14-NLV-A2 affinity measurements identify three peptide hot spots

To assess the contribution of RA14-NLV contact spots in the stabilization of the RA14-NLV-A2 complex, the affinity of the RA14 TCR for A2 bound to the native NLV peptide and nine NLV variants (P4G, P4A, M5S, M5T, M5V, M5Q, T8A, T8S, and T8V) was measured by SPR. Both kinetic and steady state binding experiments were performed. For the native NLV peptide and all the variants, binding of A2 onto immobilized TCR was characterized by fast association and dissociation. Indeed, due to the speed of the association/dissociation process, none of the association ( $K_{on}$ ) or dissociation ( $K_{off}$ ) constants could be reliably evaluated, except for the k<sub>off</sub> corresponding to wild-type NLV peptide (data not shown). Affinities ( $K_{D}$ ) were thus derived from steady state experiments (Table I and Fig. S1). The wild-type NLV-A2 has the highest affinity for RA14 with a K<sub>D</sub> of 27.7  $\mu$ M, followed by the T8S NLV

		No. Diadia -	Healthy	/ Donors	IS Pa	tients
Sequence	TCR	Motifs	Rec.	f(%)	Rec.	f(%)
Public 1	AV24-AJ49 BV6-5	4	3/5	<45	4/12	>91
RA15	AV24-AJ49 BV6-1	3			1/12	100
M1	AV24–AJ49 BV27	4	1/5	<6		
Public 2	AV24–AJ49 BV27	4	1/5	14	1/12	100
RA17R4	AV8-3-AJ49 BV6-5	3			1/12	43
M2	AV8-3-AJ49 BV27	3	1/5	<6		
GR2	AV8-3-AJ20 BV6-5	2			1/12	97
HD33.5	AV3-AJ35 BV28	2	1/5	nd		
GR3	AV3-AJ26 BV28	1			1/12	98
RA5PBL	AV26-2-AJ53 BV27	2			1/12	100
R22	AV26-2-AJ43 BV30	1			1/12	33
HD55.2	AV26-2-AJ36 BV4-3	0	1/5	nd		
HD55.23	AV5-AJ36 BV13	0	1/5	nd		
Public 3	AV5-AJ44 BV30	0	2/5	<63	1/12	99
HD44.1	AV5-AJ6 BV24-1	0	1/5	nd		
	AV12-3-AJ49 BV12-3	1	1/5	nd		
Public 4	AV35-AJ50 BV12-3	1	2/5	>67		
	AV41–AJ48 BV27	2			1/12	10
	AV21-AJ44 BV20-1	0	1/5	2		

Table III. Overrepresentation of motifs involved in key interactions between RA14 TCR and NLV-A2 among TCR dominating the NLV-specific repertoire in patients prone to HCMV reactivation<sup>a</sup>

<sup>*a*</sup> Each line corresponds to highly related or identical TCR sequences whose TRAV-TRAJ-TRBV gene composition and number of key NLV-A2 binding motifs shared with the RA14 TCR (Asn29 and Tyr31 in CDR1 $\alpha$ , Asn96 in CDR3 $\alpha$ , Glu30 in CDR1 $\beta$ , and Tyr48 and Asp56 in CDR2 $\beta$ ) are indicated in the second and third columns, respectively. When a given TCR sequence is found in several individuals, the maximal (<x) or minimal (>x) percentage of cells expressing the corresponding TCR are indicated. Note that most NLV-specific TCR carrying three or more tightly involved motifs are expressed by the vast majority (>90%) of NLV-specific T cells in six of 12 immunosuppressed patients, but by a small fraction only of NLV-specific T cells in healthy donors. By contrast, TCR carrying two or less tightly involved motifs are preferentially found within NLVspecific T cell lines from healthy donors.

IS, Immunosuppressed; nd, not determined; Rec., the interindividual recurrence of the corresponding TCR sequence among NLV-specific T cell lines derived from five healthy donors and 12 immunosuppressed patients; f(%), the percentage of cells expressing the corresponding TCR within each NLV-specific T cell line (numbers are in bold when this percentage is above 66.67%).

variants with 42.7 µM. Five variants (P4G, P4A, M5T, M5V, and M5Q) have an affinity between 58 and 69  $\mu$ M, and the last three (M5S, T8A, and T8V) do not interact detectably with the RA14 TCR. The  $K_D$  obtained for the NLV peptide differs significantly from that recently determined by Gakamsky et al. (6.3  $\mu$ M) (31), although the estimated  $k_{off}$  is quite similar (0.675 s<sup>-1</sup> vs 0.44 s<sup>-1</sup> in the present and previous study, respectively). The different experimental setup (see Materials and Methods) accounts for such a difference because the binding of RA14 to the immobilized NLV-A2 through the C-ter end of the A2 H chain provided affinity values closer to that observed by Gakamsky et al. (31 and data not shown) and presumably more directly comparable to other TCRpMHC  $K_D$  values published previously. As the absolute  $K_D$  value remains to be precisely cross-checked with other techniques, such as isothermal titration calorimetry, the present setup is optimal for the affinity comparison of the different NLV variants because all NLV-A2 complexes were tested on the same RA14-loaded surface. Binding data drawn from NLV variants clearly establish the significant contribution of peptide positions 4, 5, and 8 to the stability of the RA14-NLV-A2 complex, fully supporting structural data described above. It truly identifies Pro4, Met5, and Thr8 as peptide hot spots.

## *RA14 T cell clone activation by NLV variants confirms the three peptide hot spots*

The functional impact of each of the above mutations on RA14 clone activation was assessed in cytotoxicity assays against TAP-deficient A2-positive target cells loaded with graded doses of peptide. The highest  $EC_{50}$  value was obtained with the wild-type peptide, followed by T8S and P4A variants (Table I). P4G and all the M5 variants were still able to activate RA14, though at significantly higher concentrations than the wild-type peptide, whereas

T8V and T8A mutants were no longer recognized by RA14. Because all these mutants showed similar or even higher affinity for A2, as suggested by their ability to stabilize surface-A2 expression on T2 TAP-deficient cells (Fig. S4), decreased recognition of peptide variants is likely accounted for by decreased functional avidity of RA14 clone for the corresponding pMHC complexes. Thus, the EC50 values of most mutants correlate well with the affinity of the corresponding peptide-A2 complexes for RA14 TCR estimated by SPR, except for M5S-A2. It thus confirms the role of interaction network formed between peptide position 4, 5, and 8 and the TCR in the recognition of NLV-A2 by RA14 TCR.

#### Discussion

The mechanisms underlying the emergence of public TCRs remain controversial and probably involve multiple parameters, such as recombination biases during TCR gene rearrangements, intrathymic selection, peripheral homeostatic processes, and Ag-driven selection (32). The latter process is most likely the main parameter contributing to predominant usage of public TCRs by NLV-A2specific CD8 T cells derived from immunodepressed patients undergoing HCMV reactivation. Indeed, the NLV-A2-specific repertoire in immunosuppressed patients, who are prone to HCMV reactivation, is more limited than that of healthy donors. This repertoire focusing parallels enrichment for high affinity public TCRs, with recurrent CDR1 and CDR2 motifs and conserved CDR3 length and sequence (13). Among public TCRs, those carrying TRAV24-TRAJ49 and TRBV6-5 chains were the most frequent and represented the vast majority of NLV-A2-specific T cells in four of 12 immunosuppressed patients. Those carrying at least three of the four tightly involved motifs identified in RA14 represented more that 90% of the NLV-A2-specific T cells in six of 12 immunosuppressed patients (Table III). This suggests that TRAV24-TRBV6-5 TCRs carry optimal CDR combinations to productively interact with their cognate pMHC, and are thus favored during chronic Ag stimulation. Structural analysis of the RA14 TCR, which is representative of the most frequent public high avidity and dominant NLV-A2-specific TCRs, supports this assumption and provides new insights into the structural basis of public TCR selection.

Several structures of human TCRs in complex with pMHC derived from T cell responses with reported biased usage of V(D)J gene segments have been reported. They include JM22 TCR in complex with an influenza-derived peptide (MP<sub>58-66</sub>) presented by A2 (14), LC13 TCR in complex with an EBV nuclear Ag 3-derived peptide (FLRGRAYGL, hereafter referred to as FLR) presented by HLA-B8 (15), SB27 TCR in complex with EBV BZLF1<sub>52-64</sub> peptide presented by HLA-B\*3508 (33), ELS4 TCR in complex with BZLF1<sub>54-64</sub> peptide presented by HLA-B\*3501 (34), and HA1.7 TCR in complex with an influenza hemagglutinderived peptide (HA<sub>306-318</sub>) presented by HLA-DR1 (35). However, the most relevant structural comparison is certainly with the two public TCRs in complex with immunodominant pMHCI that have been crystallized so far, JM22-MP<sub>58-66</sub>-A2 and LC13-FLR-HLA-B8.

The JM22-MP<sub>58-66</sub>-A2 complex structure showed involvement of the three  $\beta$ -chain CDRs in peptide interactions but limited contribution of the V $\alpha$  domain to the TCR-pMHC interface, in agreement with a much less stringent selection of the latter chain (14). Moreover, the JM22 Arg98<sup> $\beta$ </sup> is inserted into a notch between the peptide and the A2  $\alpha$ 2 helix while the peptide is essentially featureless, in that it has a minimal fraction of its molecular surface bulging out of the peptide binding groove (247 Å<sup>2</sup> of peptide accessible surface exposed). Therefore, the JM22 CDR3 $\beta$  motif (Arg98-Ser99) associated with TRBV19\*01 CDR1 $\beta$  and CDR2 $\beta$ provides a unique solution for the MP<sub>58-66</sub>-A2 recognition and explains the highly constrained TRBV repertoire and CDR3 $\beta$  sequences of MP<sub>58-66</sub>-specific TCR (36, 37).

In the case of the public T cell response against the HLA-B8restricted FLR epitope, the repertoire comprises clones expressing almost identical TCR $\alpha$ - and  $\beta$ -chains and rests primarily on the TRAV26-TRAJ52 and TRBV7-8-TRBD1-TRBJ2-7 gene segment combination (38), although public TCRs with different V(D)J usage may cope with the same pMHC complex (39). The crystal structure of one such TCR (LC13) showed a significant involvement of five CDRs in the interaction with the pMHC (15), in full agreement with selection constraints on both chains. The CDR1 and CDR3 tightly contact through residues unique to TRAV26-2\*01, TRBD1/2 and TRBJ2-7\*01, the bulging tyrosine at peptide position 7, the latter contributing the most to the peptide solvent accessible surface (95 of 250 Å<sup>2</sup> for the whole peptide). For these two public TCRs, recognition essentially relies on optimal interactions with one specific feature of the pMHC surface. Presumably, the number of TCRs able to productively interact with such a confined part of the pMHC is very limited and consistent with the quasi-monoclonal repertoire observed for these two cases. Indeed, depletion of TRBV19\*01<sup>+</sup> T cells abrogates the MP<sub>58-66</sub>-A2-specific response in most donors (36). For FLR-B8, the T cell clonotype that dominates the response is deleted in HLA-B44\*01<sup>+</sup> individuals through a self-tolerance mechanism. In such individuals, the oligoclonal response that includes public clones targets a different epitope involving the N- rather than the C-terminal region of the FLR peptide (39).

RA14-NLV-A2 departs from these two aforementioned examples. Because the antigenic peptide is significantly more exposed to the solvent in NLV-A2 (355 Å<sup>2</sup>), it cannot be considered as featureless as MP<sub>58-66</sub>. RA14 does not focus on one particular

bulging residue, as observed for LC13, nor does it conform to the peg-notch type of recognition adopted in the two previous examples. Instead, four of its CDRs (CDR1 $\alpha$ , CDR1 $\beta$ , CDR3 $\alpha$ , and CDR3 $\beta$ ) bury most of the peptide surface and interact with three peptide hot spots through a network of hydrophobic and polar interactions involving the moderately bulging Pro4<sup>P</sup>, Met5<sup>P</sup>, and Thr8<sup>P</sup>. The significance of these three hot spots in stabilizing the TCR-pMHC complex is demonstrated by binding and T cell activation data on NLV variants. The wild-type NLV peptide displays the highest affinity for RA14 and triggers the most robust cytotoxic responses when used to stimulate the RA14 CTL clone (Table I), whereas a decrease of the affinity is observed for amino acid substitution at positions 4, 5, and 8. Modification of Met5<sup>P</sup> has the most pronounced effect, M5A being the only variant that remains able to activate RA14 CTL clones, albeit much less efficiently (data not shown). Conservative change of Thr8<sup>P</sup> to a serine induces a moderate decrease in the affinity and activation efficacy, whereas a change to either a valine or alanine impairs both RA14 interaction and RA14 CTL clone activation and highlights the role of the hydrogen bonds involving Thr8<sup>P</sup> side chain. As confirmed by NLV variants-A2 binary structures, no peptide conformational change induced by replacement of  $\text{Met5}^{\rm P}$  or  $\text{Thr8}^{\rm P}$  with other amino acids which could have accounted for the change in TCR binding was observed for these variants (Fig. S5 and Table S1). Overall, these results confirm the substantial role of three different peptide hot spots and corroborate structural data showing that these three positions are actually the most contacted by the RA14 TCR.

As previously described for other TCRs (40, 41), several key residues, located on CDR1 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$ , CDR1 $\beta$ , and CDR2 $\beta$ , provide a structural rational for biased usage of particular V(D)J segments within the NLV-specific repertoire. For instance, Asn $29^{\alpha}$ and Tyr31<sup> $\alpha$ </sup> belong to a key motif that is exclusively found in TRAV24, whereas Tyr31<sup> $\alpha$ </sup> alone is found in the TRAV21 segment, which is also used by other NLV-specific TCRs. Asn96<sup> $\alpha$ </sup> in RA14 (TRAJ49) is also shared by the TRAJ43 gene segment found in several NLV-specific clones. Glu $30^{\beta}$ , which is quite scarce among TRBV genes, is shared by three TRBV segments (TRBV6-5, -27, and -28) frequently used by NLV-specific TCR. The hydrophobic character of the CDR2 $\beta$  observed in TRBV6-5 and TRBV27 and the conservation of Tyr48<sup> $\beta$ </sup> and Asp56<sup> $\beta$ </sup> in TRBV6-1, -7-6, -12-3, -27, and -30 suggests a conserved mode of contact with A2 for this CDR. The occurrence of each of the above key motifs is much higher in NLV-A2-specific TCR sequence than in their respective V or J segments. Therefore, their selection either alone or in combination during chronic CMV reactivation is likely due to their ability to form specific contacts with NLV-A2.

Our results further exemplify that a specific TRBV segment (6-5) can bind the same MHC molecule in different ways. Thanks to a combination with TRAJ49, the positioning of TRBV6-5 seems driven by a dense hydrogen bond network with Gln72<sup>H</sup> highlighting the latter residue as a fourth interacting spot.

In conclusion, our study highlights the structural characteristics that could explain the immunodominance of the RA14 TCR in response to NLV-A2 in an immunodepressed context associated with HCMV reactivation. The mechanism contrasts from that observed for the immunodominant  $MP_{58-66}$ -A2 and FLR-B8 pMHC because the quasi-unique TCRs used for their recognition essentially interact with a unique feature on the pMHC surface (14, 15). Instead, RA14 buries most of the peptide and forms tight contact with three peptide residues and one A2 amino acid. The combination of TRAV, TRAJ, and TRBV appears optimal to establish this four-spot recognition. Sequence comparison of other NLV-A2-specific TCRs shows that they share most of the key contacting residues and suggests that most of the high avidity TCRs could

adopt a similar recognition mode. Confirming this hypothesis would require supplemental structural and interaction data on different private and public NLV-specific TCRs. Nevertheless, the present data indicate that forming optimal interaction with the four identified spots appears to be the structural solution for the affinity-driven emergence of an optimal public TCR among an oligoclonal Ag-specific response after repeated antigenic stimulations. This solution is based on a TCR with a marked structural complementarity with the full array of the available peptide residues.

#### Acknowledgments

We thank J. McCarthy (ID29), D. Flot (ID23-2), and S. McSweeney and D. Hall (ID14-2) for help with synchrotron data collections at the ESRF (Grenoble, France), the staff of the EMBL HTX laboratory (Grenoble, France) for the use of the PSB crystallization platform, E. Forest and B. Dublet for the use of the mass spectroscopy PSB platform and D. Hart (EMBL Grenoble, France) and J. Rossjohn (Monash University, Clayton, Australia) for careful reading of the manuscript.

#### Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

#### References

- Sissons, J. G., M. Bain, and M. R. Wills. 2002. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. J. Infect. 44: 73–77.
- Borysiewicz, L. K., J. K. Hickling, S. Graham, J. Sinclair, M. P. Cranage, G. L. Smith, and J. G. Sissons. 1988. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Exp. Med.* 168: 919–931.
- Quinnan, G. V., Jr., W. H. Burns, N. Kirmani, A. H. Rook, J. Manischewitz, L. Jackson, G. W. Santos, and R. Saral. 1984. HLA-restricted cytotoxic T lymphocytes are an early immune response and important defense mechanism in cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis.* 6: 156–163.
- McLaughlin-Taylor, E., H. Pande, S. J. Forman, B. Tanamachi, C. R. Li, J. A. Zaia, P. D. Greenberg, and S. R. Riddell. 1994. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. J. Med. Virol. 43: 103–110.
- Wills, M. R., A. J. Carmichael, K. Mynard, X. Jin, M. P. Weekes, B. Plachter, and J. G. Sissons. 1996. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. J. Virol. 70: 7569–7579.
- Saulquin, X., C. Ibisch, M. A. Peyrat, E. Scotet, M. Hourmant, H. Vie, M. Bonneville, and E. Houssaint. 2000. A global appraisal of immunodominant CD8 T cell responses to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus by bulk screening. *Eur. J. Immunol.* 30: 2531–2539.
- Kern, F., I. P. Surel, N. Faulhaber, C. Frommel, J. Schneider-Mergener, C. Schonemann, P. Reinke, and H. D. Volk. 1999. Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. J. Virol. 73: 8179–8184.
- Khan, N., M. Cobbold, R. Keenan, and P. A. Moss. 2002. Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. J. Infect. Dis. 185: 1025–1034.
- Engstrand, M., C. Tournay, M. A. Peyrat, B. M. Eriksson, J. Wadstrom, B. Z. Wirgart, F. Romagne, M. Bonneville, T. H. Totterman, and O. Korsgren. 2000. Characterization of CMVpp65-specific CD8+ T lymphocytes using MHC tetramers in kidney transplant patients and healthy participants. *Transplantation* 69: 2243–2250.
- Diamond, D. J., J. York, J. Y. Sun, C. L. Wright, and S. J. Forman. 1997. Development of a candidate HLA A\*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* 90: 1751–1767.
- Peggs, K., S. Verfuerth, A. Pizzey, J. Ainsworth, P. Moss, and S. Mackinnon. 2002. Characterization of human cytomegalovirus peptide-specific CD8(+) Tcell repertoire diversity following in vitro restimulation by antigen-pulsed dendritic cells. *Blood* 99: 213–223.
- Weekes, M. P., M. R. Wills, K. Mynard, A. J. Carmichael, and J. G. Sissons. 1999. The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. J. Virol. 73: 2099–2108.
- Trautmann, L., M. Rimbert, K. Echasserieau, X. Saulquin, B. Neveu, J. Dechanet, V. Cerundolo, and M. Bonneville. 2005. Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. J. Immunol. 175: 6123–6132.
- 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: 657–663.
- 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  $\alpha\beta$  T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity* 18: 53–64.

- Garboczi, D. N., D. T. Hung, and D. C. Wiley. 1992. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3429–3433.
- Bodinier, M., M. A. Peyrat, C. Tournay, F. Davodeau, F. Romagne, M. Bonneville, and F. Lang. 2000. Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding. *Nat. Med.* 6: 707–710.
- Neveu, B., K. Echasserieau, T. Hill, K. Kuus-Reichel, E. Houssaint, M. Bonneville, and X. Saulquin. 2006. Impact of CD8-MHC class I interaction in detection and sorting efficiencies of antigen-specific T cells using MHC class I/peptide multimers: contribution of pMHC valency. *Int. Immunol.* 18: 1139–1145.
- Kabsch, W. 1993. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. J. Appl. Crystallogr. 26: 795–800.
- Navaza, J. 1994. AMoRe: an automated package for molecular replacement. Acta Crystallogr. A. 50: 157–163.
- Hillig, R. C., P. G. Coulie, V. Stroobant, W. Saenger, A. Ziegler, and M. Hulsmeyer. 2001. High-resolution structure of HLA-A\*0201 in complex with a tumour-specific antigenic peptide encoded by the MAGE-A4 gene. *J. Mol. Biol.* 310: 1167–1176.
- 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, et al. 2005. Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *J. Exp. Med.* 201: 1243–1255.
- Collaborative Computational Project Number 4. 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D.* 50: 760–763.
- Jones, T. A., J. Y. Zou, S. W. Cowan, and Kjeldgaard. 1991. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A.* 47: 110–119.
- Emsley, P., and K. Cowtan. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D. 60: 2126–2132.
- Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanovic. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213–219.
- Lefranc, M. P. 2001. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res. 29: 207–209.
- Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, and I. A. Wilson. 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. Annu. Rev. Immunol. 24: 419–466.
- Marrack, P., J. P. Scott-Browne, S. Dai, L. Gapin, and J. W. Kappler. 2008. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 171–203.
- Feng, D., C. J. Bond, L. K. Ely, J. Maynard, and K. C. Garcia. 2007. Structural evidence for a germline-encoded T cell receptor-major histocompatibility complex interaction "codon." *Nat. Immunol.* 8: 975–983.
- Gakamsky, D. M., E. Lewitzki, E. Grell, X. Saulquin, B. Malissen, F. Montero-Julian, M. Bonneville, and I. Pecht. 2007. Kinetic evidence for a ligand-binding-induced conformational transition in the T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 16639–16644.
- Venturi, V., D. A. Price, D. C. Douek, and M. P. Davenport. 2008. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat. Rev. Immunol.* 8: 231–238.
- 33. 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, et al. 2005. T cell receptor recognition of a "super-bulged" major histocompatibility complex class I-bound peptide. *Nat. Immunol.* 6: 1114–1122.
- 34. 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, et al. 2007. A T cell receptor flattens a bulged antigenic peptide presented by a major histocompatibility complex class I molecule. *Nat. Immunol.* 8: 268–276.
- Hennecke, J., A. Carfi, and D. C. Wiley. 2000. Structure of a covalently stabilized complex of a human αβ T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1. *EMBO J.* 19: 5611–5624.
- 36. Lehner, P. J., E. C. Wang, P. A. Moss, S. Williams, K. Platt, S. M. Friedman, J. I. Bell, and L. K. Borysiewicz. 1995. Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V β 17 gene segment. J. Exp. Med. 181: 79–91.
- 37. Moss, P. A., R. J. Moots, W. M. Rosenberg, S. J. Rowland-Jones, H. C. Bodmer, A. J. McMichael, and J. I. Bell. 1991. Extensive conservation of α and β chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8987–8990.
- Argaet, V. P., C. W. Schmidt, S. R. Burrows, S. L. Silins, M. G. Kurilla, D. L. Doolan, A. Suhrbier, D. J. Moss, E. Kieff, T. B. Sculley, and I. S. Misko. 1994. Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. J. Exp. Med. 180: 2335–2340.
- Burrows, S. R., S. L. Silins, D. J. Moss, R. Khanna, I. S. Misko, and V. P. Argaet. 1995. T cell receptor repertoire for a viral epitope in humans is diversified by tolerance to a background major histocompatibility complex antigen. *J. Exp. Med.* 182: 1703–1715.
- 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: 883–894.
- Gras, S., L. Kjer-Nielsen, S. R. Burrows, J. McCluskey, and J. Rossjohn. 2008. T-cell receptor bias and immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 119–125.

## II. ARTICLE 4: CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY CRYSTALLOGRAPHIC CHARACTERIZATION OF A PUBLIC CMV-SPECIFIC TCR IN COMPLEX WITH ITS COGNATE AG

Reiser JB, <u>Legoux F</u>, Machillot P, Debeaupuis E, Le Moullac-Vaydie B, Chouquet A, Saulquin X, Bonneville M, Housset D.

#### Acta Crystallografica Section F 2009 (65):1157-61

La plupart des TCR publics pp65/A2-spécifiques de forte affinité possède un ou plusieurs des résidus de contact du TCR précédemment cristallisé (Gras et al., 2009), ce qui suggère un mode de reconnaissance du pCMH partagé. Ces résidus clefs sont localisés dans les CDR2 $\alpha$ , CDR3 $\alpha$  et CDR1 $\beta$ , et peuvent fournir une base structurale de la récurrence de segments V(D)J particuliers au sein du répertoire pp65/A2-spécifique. La survenue de chacun de ces motifs clefs est beaucoup plus fréquente dans la séquence des TCR pp65/A2 spécifiques que dans des segments V ou J choisis au hasard sur le locus du TCR. Leur sélection (seuls ou en combinaison avec d'autres) au cours de réactivations chroniques du CMV peut donc être due à leur capacité à établir des contacts spécifiques avec pp65/A2.

Pour tester l'hypothèse d'un mode de reconnaissance partagé par les TCR publics dirigés contre le CMV, nous avons résolu la structure d'un second TCR public, RA15, en complexe avec pp65/A2. L'analyse cristallographique révèle un docking similaire à RA14 sur son ligand, indiquant que la focalisation du répertoire T au cours des réactivations virales s'accompagne effectivement d'une sélection des clonotypes engageant pp65/A2 de façon optimale.

Ma contribution à cette étude a été de cloner, produire en corps d'inclusions, purifier et renaturer les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR RA15 en vue de leur cristallisation en complexe avec pp65/A2.
Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications

ISSN 1744-3091

Jean-Baptiste Reiser,<sup>a</sup> François Legoux,<sup>b,c</sup> Paul Machillot,<sup>a</sup> Emilie Debeaupuis,<sup>b,c</sup> Béatrice Le Moullac-Vaydie,<sup>b,c</sup> Anne Chouquet,<sup>a</sup> Xavier Saulquin,<sup>b,c</sup> Marc Bonneville<sup>b,c</sup>\* and Dominique Housset<sup>a</sup>\*

<sup>a</sup>Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 (CEA, CNRS, UJF, PSB), 41 Rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble, France, <sup>b</sup>INSERM, UMR 892, Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, 8 Quai Moncousu, BP 70721 F-44007 Nantes, France, and <sup>c</sup>Université de Nantes, Nantes, France

Correspondence e-mail: bonnevil@nantes.inserm.fr, dominique.housset@ibs.fr

Received 27 July 2009 Accepted 18 September 2009



© 2009 International Union of Crystallography All rights reserved

## Crystallization and preliminary X-ray crystallographic characterization of a public CMV-specific TCR in complex with its cognate antigen

The T-cell response to human cytomegalovirus is characterized by a dramatic reduction of clonal diversity in patients undergoing chronic inflammation or immunodepression. In order to check whether all the selected high-avidity T-cell clones recognize the immunodominant pp65 peptide antigen pp65495-503 (NLVPMVATV) presented by the major histocompatibility complex (MHC) molecule HLA-A2 in a similar manner, several public high-affinity T-cell receptors (TCRs) specific for the  $pp65_{495-503}$ -HLA-A2 complex have been investigated. Expression, purification and crystallization were performed and preliminary crystallographic data were collected to 4.7 Å resolution for the RA15 TCR in complex with the pp65<sub>495-503</sub>-HLA-A2 complex. Comparison of the RA15-pp65<sub>495-503</sub>-HLA-A2 complex molecular-replacement solution with the structure of another high-affinity pp65495-503-HLA-A2-specific TCR, RA14, shows a shared docking mode, indicating that the clonal focusing could be accompanied by the selection of a most favoured peptide-readout mode. However, the position of the RA15 V $\beta$  domain is significantly shifted, suggesting a different interatomic interaction network.

### 1. Introduction

Human cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous  $\beta$ -herpesvirus that infects 60-90% of the population. HCMV persists in a latent stage after the primary infection and can undergo transient reactivations. Although HCMV infections are kept in check by the immune system of healthy individuals, they can cause life-threatening diseases in immunodeficient patients (Sissons et al., 2002). Cytotoxic T cells (CTLs) play a central role in controlling HCMV reactivation (Borysiewicz et al., 1988; Quinnan et al., 1984; McLaughlin-Taylor et al., 1994; Wills et al., 1996; Saulquin et al., 2000) and the predominant CTL response is directed against the viral tegument protein pp65 (Wills et al., 1996; Engstrand et al., 2000). In individuals sharing the widespread HLA-A\*0201 allele (referred to as A2), HCMV-specific CTLs recognize the same epitope pp65495-503 (NLVPMVATV), hereafter referred to as NLV (Wills et al., 1996; Diamond et al., 1997; Peggs et al., 2002). During chronic inflammation (e.g. in rheumatoid arthritis patients) and immunodepression, a dramatic reduction in clonal diversity occurs, resulting in the selection of a few dominant clones bearing high-affinity TCRs (Trautmann et al., 2005). We have recently determined the crystal structures of the immunodominant NLV peptide bound to A2 in isolation or in complex with a high-avidity public TCR expressed by a predominant CTL clone (RA14) derived from a rheumatoid arthritis (RA) patient (Trautmann et al., 2005) and have gained insight into the mechanisms underlying clonal focusing upon chronic antigen stimulation (Gras, Saulquin et al., 2009). Here, we present preliminary X-ray diffraction data for another highavidity NLV-A2 specific TCR, RA15, in complex with NLV-A2. This TCR shares the same V $\alpha$  domain (TRAV24–TRAJ49, according to IMGT nomenclature; Lefranc, 2001) with RA14 but has a different  $V\beta$  domain (TRBV6-1 instead of TRBV6-5) and lacks some of the

essential NLV-contacting residues identified in RA14. The structure of RA15 in complex with NLV-A2 would therefore be extremely useful to check whether the extraordinary clonal focusing that occurs upon chronic reactivation is accompanied by the selection of a common NLV-A2 readout mode. The molecular-replacement solution indicates at least a convergent mode of docking.

### 2. Experimental methods

#### 2.1. RA15 TCR cloning

However, attempts to obtain soluble RA15 TCR using this construct inexorably led to aggregates of TCR and an unsuitable yield of soluble protein for protein crystallization. In 2003, Boutler and coworkers demonstrated the efficacy of introducing non-native interchain disulfide bonds between the two constant domains in order to produce soluble TCRs without altering either the pMHC-binding capacity or the ternary complex crystallization (Boulter et al., 2003). Cysteine codons were then introduced into pET22b-RA15a and pET22b-RA15 $\beta$  by PCR mutagenesis. Complementary primers were designed in order to mutate into cysteines (bold codons) Thr48 in TRAC (5'-GATGTGTATATCACAGACAAATGTGTGCTAGAC-ATGAGGTCTATG-3' and 5'-CATAGACCTCATGTCTAGCAC-ACATTTGTCTGTGATATACACATC-3) and Ser57 in TRBC (5'-GGTGCACAGTGGGGTCTGTACAGACCCGCAGCCC-3' and 5'-GGGCTGCGGGTCTGTACAGACCCCACTGTGCACC-3'). These primers were then used with the QuikChange II kit (Stratagene, La Jolla, California, USA) and the pET22b constructs previously obtained as PCR templates. The site-directed mutagenesis results were confirmed by DNA sequencing.

#### 2.2. Protein expression and purification of RA15 TCR

Cysteine-mutated RA15  $\alpha$ -chain and  $\beta$ -chain were produced separately as inclusion bodies in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) RIPL (Stratagene, La Jolla, California, USA) by the induction of a 3 l culture with 1 mM IPTG when the optical density reached 0.6 at a wavelength of 600 nm followed by 3 h incubation at 310 K. Inclusion bodies were isolated by cell lysis performed with a French press followed by successive washing and centrifugation steps with 15 ml of a solution containing 50 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT. The last wash step was made with a solution containing the same constituents apart from Triton X-100. Finally, inclusion bodies were solubilized in 8 M urea, 50 mM MES pH 6.5, 0.1 mM DTT and 0.1 mM EDTA and stored at 193 K before use.

Prior to refolding, 30 mg of both chains were mixed in 6 M guanidine–HCl, 50 mM MES pH 6.5, 10 mM EDTA, 2 mM DTT and 1 mM sodium acetate. RA15 TCR was then refolded by flash dilution into 500 ml of a cold (277 K) solution containing 3 M urea, 200 mM arginine–HCl, 150 mM Tris pH 8, 1.5 mM reduced glutathione and 0.15 mM oxidized glutathione. After incubation for 72 h at 277 K, the folding solution was dialyzed against 10 mM Tris pH 8.5 and 50 mM

#### Table 1

Crystallographic data-collection and refinement statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Data-collection statistics	
Space group	P42212
Unit-cell parameters (Å)	a = b = 99.14, c = 229.06
Resolution (Å)	50.0-4.7 (4.95-4.7)
$R_{\text{merge}}$ † (%)	8.3 (40.7)
Completeness (%)	91.0 (92.7)
$I/\sigma(I)$	10.4 (2.99)
No. of reflections	21804 (3122)
No. of unique reflections	5856 (817)
Molecular-replacement statistics	
Resolution (Å)	15.0-4.7
Two-body rigid-body refinement	
Correlation coefficient (%)	68.2
R factor‡ (%)	52.3
Seven-body rigid-body refinement	
Correlation coefficient (%)	69.8
R factor‡ (%)	50.9

 $\label{eq:rescaled_rescaled$ 

NaCl for 24 h and against 10 m*M* Tris pH 8.5 for 48 h at 277 K. The resulting protein solution was then concentrated using a 10 kDa membrane (Vivacell, Vivascience AG, Germany) and purified on a size-exclusion column (HiLoad 16/60 Superdex 200) equilibrated in 10 m*M* Tris pH 8.5 and 20 m*M* NaCl and connected to an FPLC system (Purifier 10, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). The fractions containing soluble TCR were analyzed by Coomassie-stained SDS–PAGE electrophoresis under reducing and non-reducing conditions. Fractions containing equal quantities of both  $\alpha$ -chain and  $\beta$ -chain were pooled, concentrated on Amicon with a cutoff of 30 kDa to a concentration of about 2 mg ml<sup>-1</sup> and frozen at 193 K before further use. An aliquot was analyzed by mass spectrometry (MALDI–TOF) and confirmed the presence of RA15 TCR  $\alpha/\beta$  dimers.

Prior to crystallization, samples of TCR were thawed and cleaned from aggregates and remaining single chains on an size-exclusion column (HiLoad 16/60 Superdex 75) equilibrated as previously and finally concentrated to a final concentration of  $2-3 \text{ mg ml}^{-1}$ .

#### 2.3. Protein expression and purification of NLV-HLA-A2

HLA-A\*0201 heavy chain and  $\beta_2$ -microglobulin were produced separately as described previously (Garboczi et al., 1992; Bodinier et al., 2000; Gras, Saulquin et al., 2009). In brief, the A245V mutant of the HLA-A\*0201 heavy chain tagged at the C-terminus with a biotinylation sequence was cloned into pHN1 expression vector as described in Bodinier et al. (2000). Recombinant proteins were produced as inclusion bodies in E. coli strain XA90F'LaqQ1. The inclusion bodies were resuspended in 8 M urea, 50 mM MES pH 6.5, 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, incubated overnight at 277 K and centrifuged for 30 min at 100 000g. The supernatant was collected and frozen at 193 K. The pMHC complex refolding step was performed by flash dilution of a mixture of 21 mg HLA-A\*0201, 10 mg  $\beta_2$ -microglobulin and 10 mg of the NLV synthetic peptide into 350 ml 100 mM Tris pH 8.0, 400 mM L-arginine-HCl, 2 mM EDTA, 5 mM reduced glutathione, 0.5 mM oxidized glutathione with two Complete EDTA-free Cocktail protease-inhibitor tablets (Roche Diagnostics). The refolding solution was then incubated for 4-5 d at 277 K and concentrated with a 30 kDa cutoff membrane (Vivacell system). The pMHC complex was purified on a MonoQ 5/50 column with an FPLC system equilibrated in 10 mM Tris pH 8.0 buffer. It was eluted with

100–150 mM NaCl and concentrated with Amicon-10 or Amicon-30 devices to a final protein concentration of 2.5-3.5 mg ml<sup>-1</sup>.

### 2.4. Crystallization

Prior to crystallization, RA15 TCR and HLA-A2–NLV were mixed in an equal molar ratio and at a final complex concentration of 3 mg ml<sup>-1</sup>. Crystallization conditions were initially screened at 293 and 277 K using a Cartesian nanodrop crystallization robot available at the PSB HTX laboratory (Grenoble, France) and using JBScreen Classic screens (Jena Biosciences, Jena, Germany) and home-made screens with PEG (3350, 4000 and 6000), buffers at several pH values (NaCH<sub>3</sub>COO, MES, HEPES and Tris) and salts (LiCl, LiSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> and MgSO<sub>4</sub>).

Initial tiny crystals of the RA15–NLV–A2 complex were obtained after several weeks from these screens at 277 K and in conditions containing PEG 4000, Tris pH 8.0–8.5 and MgSO<sub>4</sub>. These conditions were then refined using the hanging-drop technique by mixing 2  $\mu$ l protein solution and 2  $\mu$ l reservoir solution. The conditions were optimized by varying the concentration of PEG 4000 and MgSO<sub>4</sub> and the pH in the range 8.0–8.5 for the 100 m*M* Tris buffer.

The best crystals were obtained after several weeks at 277 K in conditions containing 17–18% PEG 4000, 100 mM Tris pH 8.5, 100–35 mM MgSO<sub>4</sub>.

# 2.5. Diffraction data collection, processing and molecular replacement solution

Prior to being flash-frozen in liquid nitrogen for diffraction experiments, crystals were soaked in a cryoprotectant solution (mother liquor with the PEG 6000 concentration increased to 30%). Several crystals were tested for diffraction on beamline ID23-eh2 of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) using an ADSC Q4 CCD detector at a wavelength of 0.873 Å. For most of the crystals, very weak diffraction was observed to 6 Å resolution. Only one crystal gave reasonable diffraction to 4.7 Å resolution (Fig. 1). A full data set was then collected at 100 K within 90° total angular range and a 1° oscillation step per image.

Data processing was performed using *XDS* (Kabsch, 1993) and is summarized in Table 1. The RA15–NLV–A2 complex crystals belonged to the tetragonal space group  $P4_22_12$ , with unit-cell parameters a = b = 99.14, c = 229.06 Å.

Structure determination of RA15–NLV–A2 was performed by molecular replacement with *AMoRe* (Navaza, 1994) using the RA14 and NVL–A2 crystal structures (Gras, Saulquin *et al.*, 2009; PDB code 3gsn) as initial and independent models. Clear contrasted rotation-



#### Figure 1

function solutions were found for both the TCR and the pMHC independently and the translation function provided a unique solution for one TCR-pMHC ternary complex per asymmetric unit. Extra rigid-body refinement cycles were performed with *AMoRe* by defining seven rigid bodies (NLV MHC $\alpha$ 1 $\alpha$ 2 and MHC $\alpha$ 3 domains,  $\beta_2$ -microglobulin, TCR V $\alpha$ , C $\alpha$ , V $\beta$  and C $\beta$  domains) with a final *R* factor of 50.9% at 4.7 Å resolution (Table 1).

#### 3. Results and discussion

We have previously solved the structure of the public RA14 TCR in complex with its cognate NLV-A2 epitope (Gras, Saulquin et al., 2009). This structure highlighted the structural characteristics that explain the immunodominance of this particular TCR in response to NLV-A2 associated with HCMV reactivation. Particularly, the emergence of an optimal public solution from an oligoclonal antigenspecific repertoire after repeated HCMV stimulations seems to be based on a TCR with a very favourable combination of TRAV, TRAJ and TRBV translating into an optimal structural complementarity between the TCR and the pMHC surface. Moreover, a significant number of RA14 TCR-contacting amino acids appear to be conserved by lower affinity TCRs, suggesting a shared TCR-pMHC docking mode and an antigen-driven selection of the best-fitted TCR. In order to validate this hypothesis, we focused our attention on another high-avidity public TCR directed against the immunodominant HCMV epitope, RA15 (TRAV24-TRAJ49-TRBV6-1). Interestingly, RA15 has less avidity for NLV-A2 than RA14 (Trautmann et al., 2005) and shares only three of the four motifs of RA14 that contact the NLV-A2 surface (Gras, Saulquin et al., 2009).

As our attempts to produce soluble RA15 TCR heterodimers with the strategy used for RA14 was unsuccessful, we looked for methods to stabilize the  $\alpha/\beta$  heterodimer. Indeed, several strategies have been developed to achieve this goal, some of which work for several TCRs: expression of single-chain variable domain (scFv; Gregoire *et al.*, 1996; Housset *et al.*, 1997), fusion with a coil-coiled heterodimeriza-



(a) View of the frozen RA15–NLV–A2 complex crystal in the loop. Scale bars represent 50  $\mu$ m. (b) Diffraction pattern of the first 1° oscillation. Resolution circles and corresponding resolution are shown in pink.

## crystallization communications



Figure 2

Superimposition of the molecular-replacement solution of the RA15–NLV–A2 complex (coloured) on the RA14–NLV–A2 complex structure (white). Superposition was performed on the  $\alpha 1 \alpha 2$  HLA-A2 domain. (a) Overall view of the superimposition, (b) closer view of the TCR–NLV–A2 interface. CDRs are coloured as follows: CDR1 $\alpha$ , green; CDR2 $\alpha$ , red; CDR3 $\alpha$ , dark blue; CDR1 $\beta$ , pale green; CDR2 $\beta$ , orange; CDR3 $\beta$ , light blue. The NLV peptide is represented by violet sticks, the HLA-A2  $\alpha 1$  helix in gold and the  $\alpha 2$  helix in silver.

tion motif (Willcox *et al.*, 1999), a membrane-proximal disulfide bridge (Stewart-Jones *et al.*, 2003) and a non-native interchain disulfide bridge (Boulter *et al.*, 2003). As the latter was successfully applied to characterize TCR–pMHC interactions (Boulter *et al.*, 2003) and ternary complex structure determination (Sami *et al.*, 2007; Archbold *et al.*, 2009; Dunn *et al.*, 2006; Tynan *et al.*, 2007; Gras, Burrows *et al.*, 2009), we decided to test it on RA15. By creating an artificial disulfide bridge between residue 48 of the C $\alpha$  domain and residue 57 of the C $\beta$  domain, we were able to produce several milligrams of cysteine mutated RA15 TCR in a soluble and homogeneous form and to crystallize it in complex with its cognate pMHC.

The crystallization strategy was based on the usage of commercial screening kits and home-made screens designed from the conditions in which other TCR–pMHC complexes were previously crystallized. This strategy appears to be suitable to find optimized conditions for a particular complex. Indeed, although TCR–pMHC ternary complexes are prone to crystallize in the presence of PEG, the buffer and pH, as well as the presence and type of secondary salts and additives, are critical to obtain well diffracting crystals. It is therefore necessary to test large screens of buffers and additives. To date, the best crystals of RA15–NLV–A2 appeared in the presence of 17–18% PEG 4000, 100 mM Tris pH 8.0–8.5 and MgSO<sub>4</sub> and the crystals tested diffracted to 4.7 Å resolution.

Using the single and complete data set obtained using synchrotron radiation, molecular replacement was employed to solve the low-resolution structure of the RA15–NLV–A2 complex as it crystallized in a different space group to that observed for RA14–NLV–A2 (Gras, Saulquin *et al.*, 2009). Rigid-body refinement was then performed at 4.7 Å resolution.

Although at a very low resolution, this new structure of a public TCR directed against the immunogenic NLV-HLA-A2 antigen provides some interesting structural features of the public nature of CMV epitope recognition. Indeed, the structure shows that RA15 docks on NLV-A2 in quite a similar way compared with the public RA14 TCR for which we have previously solved the structure. When

the  $\alpha 1 \alpha 2$  A2 domains are superimposed, the RA15 variable domain has to be rotated by  $8.5^{\circ}$  with a pivotal point close to the tip of the V $\alpha$ CDR1 loop and shifted by about 0.5 Å to be fitted onto the RA14 variable domain (Fig. 2). At the TCR-pMHC interface, the best superposed CDR is the CDR1 of the V $\alpha$  domain with a 0.3 Å translational shift, while the positions of the five other CDRs vary from 1.1 to 2.7 Å for CDR2 of the V $\beta$  domain. Quite logically, the most pronounced positional difference is observed for the domain that differs most in sequence. A small difference in the  $V\alpha$ -V $\beta$ domain pairing of RA15 is also observed, with a rotation of 4.4° for the V $\beta$  domain relative to the orientation of the V $\beta$  domain in RA14. Despite these observed differences, the NLV-A2 surface buried by the RA15 TCR is likely to be very similar to that buried by RA14. However, owing to the resolution of the present structure of the RA15-NLV-A2 complex, it is not possible to obtain a detailed view of the interactions formed by this RA15 TCR to recognize its epitope. Higher resolution crystallographic data will be required. These may possibly be obtained by further crystallization screenings, either by using finer steps in screening around the already determined crystallization conditions or by looking for additives that may help to obtain crystals of better quality.

We thank the ID23-eh2 team for help with synchrotron data collection at ESRF (Grenoble, France), the staff of the EMBL HTX laboratory (Grenoble, France) for the use of the PSB crystallization platform and E. Forest (IBS, Grenoble, France) for the use of mass spectroscopy. This study was supported in part by the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-05-MIIM-019). MB was also supported by the EPI-PEPVAC European Union grant.

#### References

Archbold, J. K., Macdonald, W. A., Gras, S., Ely, L. K., Miles, J. J., Bell, M. J., Brennan, R. M., Beddoe, T., Wilce, M. C., Clements, C. S., Purcell, A. W.,

## crystallization communications

McCluskey, J., Burrows, S. R. & Rossjohn, J. (2009). J. Exp. Med. 206, 209-219.

- Bodinier, M., Peyrat, M. A., Tournay, C., Davodeau, F., Romagne, F., Bonneville, M. & Lang, F. (2000). *Nature Med.* 6, 707–710.
- Borysiewicz, L. K., Hickling, J. K., Graham, S., Sinclair, J., Cranage, M. P., Smith, G. L. & Sissons, J. G. (1988). J. Exp. Med. 168, 919–931.
- Boulter, J. M., Glick, M., Todorov, P. T., Baston, E., Sami, M., Rizkallah, P. & Jakobsen, B. K. (2003). Protein Eng. 16, 707–711.
- Diamond, D. J., York, J., Sun, J. Y., Wright, C. L. & Forman, S. J. (1997). Blood, 90, 1751–1767.
- Dunn, S. M., Rizkallah, P. J., Baston, E., Mahon, T., Cameron, B., Moysey, R., Gao, F., Sami, M., Boulter, J., Li, Y. & Jakobsen, B. K. (2006). *Protein Sci.* 15, 710–721.
- Engstrand, M., Tournay, C., Peyrat, M. A., Eriksson, B. M., Wadstrom, J., Wirgart, B. Z., Romagne, F., Bonneville, M., Totterman, T. H. & Korsgren, O. (2000). *Transplantation*, **69**, 2243–2250.
- Garboczi, D. N., Hung, D. T. & Wiley, D. C. (1992). Proc. Natl Acad. Sci. USA, **89**, 3429–3433.
- Gras, S., Burrows, S. R., Kjer-Nielsen, L., Clements, C. S., Liu, Y. C., Sullivan, L. C., Bell, M. J., Brooks, A. G., Purcell, A. W., McCluskey, J. & Rossjohn, J. (2009). *Immunity*, **30**, 193–203.
- Gras, S., Saulquin, X., Reiser, J.-B., Debeaupuis, E., Echasserieau, K., Kissenpfennig, A., Legoux, F., Chouquet, A., Le Gorrec, M., Machillot, P., Neveu, B., Thielens, N., Malissen, B., Bonneville, M. & Housset, D. (2009). J. Immunol. 183, 430–437.
- Gregoire, C., Malissen, B. & Mazza, G. (1996). Eur. J. Immunol. 26, 2410-2416.
- Housset, D., Mazza, G., Gregoire, C., Piras, C., Malissen, B. & Fontecilla-Camps, J. C. (1997). *EMBO J.* 16, 4205–4216.

- Kabsch, W. (1993). J. Appl. Cryst. 26, 795-800.
- Lefranc, M. P. (2001). Nucleic Acids Res. 29, 207-209.
- McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C. R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D. & Riddell, S. R. (1994). J. Med. Virol. 43, 103–110. Navaza, J. (1994). Acta Cryst. A50, 157–163.
- Peggs, K., Verfuerth, S., Pizzey, A., Ainsworth, J., Moss, P. & Mackinnon, S. (2002). *Blood*, **99**, 213–223.
- Quinnan, G. V. Jr, Burns, W. H., Kirmani, N., Rook, A. H., Manischewitz, J., Jackson, L., Santos, G. W. & Saral, R. (1984). Rev. Infect. Dis. 6, 156–163.
- Sami, M., Rizkallah, P. J., Dunn, S., Molloy, P., Moysey, R., Vuidepot, A., Baston, E., Todorov, P., Li, Y., Gao, F., Boulter, J. M. & Jakobsen, B. K. (2007). Protein Eng. Des. Sel. 20, 397–403.
- Saulquin, X., Ibisch, C., Peyrat, M. A., Scotet, E., Hourmant, M., Vie, H., Bonneville, M. & Houssaint, E. (2000). Eur. J. Immunol. 30, 2531–2539.
- Sissons, J. G., Bain, M. & Wills, M. R. (2002). J. Infect. 44, 73-77.
- Stewart-Jones, G. B., McMichael, A. J., Bell, J. I., Stuart, D. I. & Jones, E. Y. (2003). Nature Immunol. 4, 657–663.
- Trautmann, L., Rimbert, M., Echasserieau, K., Saulquin, X., Neveu, B., Dechanet, J., Cerundolo, V. & Bonneville, M. (2005). *J. Immunol.* 175, 6123– 6132.
- Tynan, F. E., Reid, H. H., Kjer-Nielsen, L., Miles, J. J., Wilce, M. C., Kostenko, L., Borg, N. A., Williamson, N. A., Beddoe, T., Purcell, A. W., Burrows, S. R., McCluskey, J. & Rossjohn, J. (2007). *Nature Immunol.* 8, 268–276.
- Willcox, B. E., Gao, G. F., Wyer, J. R., O'Callaghan, C. A., Boulter, J. M., Jones, E. Y., van der Merwe, P. A., Bell, J. I. & Jakobsen, B. K. (1999). *Protein Sci.* 8, 2418–2423.
- Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B. & Sissons, J. G. (1996). J. Virol. 70, 7569–7579.

# **III.** ARTICLE **5** : Sphingosine-1-Phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis.

Bonnaud S, Niaudet C, <u>Legoux F</u>, Corre I, Delpon G, Saulquin X, Fuks Z, Gaugler MH, Kolesnick R, Paris F.

### Cancer Research 2010 (23):9905-15

La microvascularisation joue un rôle critique dans la régulation tissulaire du stress. En particulier, on sait que l'apoptose des cellules endothéliales est médiée par le céramide, un sphingolipide généré par hydrolyse de la sphingomyéline membranaire. Le sphingosine-1-phosphate (S1P), un antagoniste du céramide, peut protéger *in vitro* les cellules endothéliales quiescentes de l'apoptose radio-induite, mais le mécanisme impliqué ainsi que sa pertinence en contexte physiologique restent à investiguer.

Dans cette étude, l'équipe de F. Paris (Inserm U892, Nantes) s'est proposée de valider chez la souris le rôle du S1P dans la radioprotection des tissus en inhibant le syndrome gastrointestinal induit par l'apoptose des cellules endothéliales ayant reçues de fortes doses de radiations. Les résultats indiquent que S1P, en déclenchant la voie Akt-dépendante de façon extracellulaire, protège les souris irradiées du syndrome gastrointestinal, sans agir sur le compartiment lymphoïde.

Notre contribution à ce travail est limitée à l'étude de l'apoptose radio-induite des compartiments lymphocytaires T et B. Par cytométrie en flux, nous montrons que l'action protectrice du S1P ne s'exerce pas sur le compartiment lymphoïde.

## Sphingosine-1-Phosphate Activates the AKT Pathway to Protect Small Intestines from Radiation-Induced Endothelial Apoptosis

Stéphanie Bonnaud<sup>1</sup>, Colin Niaudet<sup>1</sup>, François Legoux<sup>1</sup>, Isabelle Corre<sup>1</sup>, Gregory Delpon<sup>2</sup>, Xavier Saulquin<sup>1</sup>, Zvi Fuks<sup>3</sup>, Marie-Hélène Gaugler<sup>1,4</sup>, Richard Kolesnick<sup>5</sup>, and François Paris<sup>1,2</sup>

#### Abstract

A previous *in vitro* study showed that sphingosine-1-phosphate (S1P), a ceramide antagonist, preserved endothelial cells in culture from radiation-induced apoptosis. We proposed to validate the role of S1P in tissue radioprotection by inhibiting acute gastrointestinal (GI) syndrome induced by endothelial cell apoptosis after high dose of radiation. Retro-orbital S1P was injected in mice exposed to 15 Gy, a dose-inducing GI syndrome within 10 days. Overall survival and apoptosis on intestines sections were studied. Intestinal cell type targeted by S1P and early molecular survival pathways were researched using irradiated *in vitro* cell models and *in vivo* mouse models. We showed that retro-orbital S1P injection before irradiation prevented GI syndrome by inhibiting endothelial cells, or B and T lymphocytes, were protected. Pharmacologic approaches using AKT inhibitor and pertussis toxin established that S1P affords endothelial cell protection *in vitro* and *in vivo* through a mechanism involving AKT and 7-pass transmembrane receptors coupled to Gi proteins. Our results provide strong pharmacologic and mechanistic proofs that S1P protects endothelial cells against acute radiation enteropathy. *Cancer Res; 70(23); 9905–15.* ©*2010 AACR.* 

### Introduction

Research has shed new light on the critical role of microvasculature collapse in tissue pathology induced by genotoxic stresses (1). A notable, but controversial, example is the involvement of microvascular endothelium in the early response to radiation. The gastrointestinal (GI) syndrome, an acute adverse effect of radiotherapy, has long been considered to be dependent solely on the dysfunction of the intestinal clonogenic compartment (2, 3). According to this single-target hypothesis, irradiation at doses of 8 Gy or greater causes rapid stem cell apoptosis at positions 4 and 5 from the base of the crypt, followed by a mitotic catastrophy 24 to 48

S. Bonnaud and C. Niaudet contributed equally to the manuscript.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2043

©2010 American Association for Cancer Research.

hours postradiation inhibiting crypt and villi regeneration. We and others challenged this single cell target model arguing for a more complex multitarget scenario. Microvascular endothelial apoptosis after single high dose of radiation constitutes a primary lesion, which contributes to stem cell dysfunction, crypt damage, villi denudation, organ failure, and death by GI syndrome (1, 4–6). This syndrome was prevented when endothelial cell apoptosis was pharmacologically inhibited in mice by intravenous injection of basic fibroblast growth factor (bFGF; ref. 1), an agonist of Toll-like receptor 5 (4) or angiopoietin-I (5) prior to irradiation.

Endothelial cell apoptosis is also triggered by ceramide, a sphingolipid generated upon hydrolysis of cell membrane sphingomyelin by acid sphingomyelinase (ASM; ref. 7). Genetic invalidation of ASM in mice inhibited the radiation-induced apoptosis of the microvascular endothelial cells (1), which inhibited GI syndrome and switched the death of the mouse to bone marrow (BM) aplasia. Sphingosine-1phosphate (S1P) is a product of ceramide deacylation and phosphorylation of the sphingosine. Both S1P and ceramide, which have opposing properties, determine cell fate (8). Although ceramide is a proapoptotic factor, S1P promotes survival by activating the PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/ AKT pathway (9). S1P signaling may act either intracellularly through yet unidentified receptor(s) (10) or extracellularly through binding to G protein-coupled receptors termed S1P receptors (11). Inhibition of ceramide-induced apoptosis by S1P has been shown in several cell lines of different origins, such as lymphocytes and tumor cells (8), and has been

Authors' Affiliations: <sup>1</sup>Inserm UMR892-Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Nantes, France; <sup>2</sup>Centre de Lutte Contre le Cancer Nantes-Atlantique, Saint-Herblain, France; <sup>3</sup>Radiation Oncology Department, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York; <sup>4</sup>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France; and <sup>5</sup>Laboratory of Signal Transduction, Sloan-Kettering Institute, New York, New York

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (http://cancerres.aacrjournals.org/).

**Corresponding Author:** François Paris, Inserm UMR892-Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, France. Phone: 33-228-080302; Fax: 33-228-080204; E-mail: francois.paris@inserm.fr.

confirmed *in vivo*. Administration of S1P 2 hours prior to exposure to 0.1 Gy protects almost the entire ovarian follicle population in mice, therefore preventing radiation-induced sterility (12).

S1P is already known to modulate endothelial functions, such as attenuate increase in vascular permeability by regulating junctional complexes (13). It has also been shown to block *in vitro* endothelial cell death induced by  $H_2O_2$  (14), ethanol (15), and serum deprivation (16). We recently showed that S1P protects human microvascular endothelial cells (HMEC-1) from radiation-induced apoptosis (17). S1P acted directly on the ceramide-mediated death, but not on radiation-induced DNA damage pathway, to protect endothelial cells from ionizing radiation. In the present study, we propose to validate the role of exogenous S1P as a relevant bioactive lipid both to promote endothelial cell survival and to inhibit in vivo one of the radiation-induced intestinal pathologies (e.g., GI syndrome). To clarify the involvement of the endothelium in the GI syndrome, we sought to determine which cell types and molecular events of the survival pathway are preferentially targeted by S1P.

#### **Materials and Methods**

#### Cell lines, irradiation, and drug protocols

HMEC-1 and IEC-6 (intestinal epithelial cells) were kindly provided by F.J. Candal (Center for Disease Control) and M. Neunlist (Inserm UMR913, Nantes). Both were seeded at  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> as described (17, 18). Irradiation was carried out in a Faxitron CP160 irradiator (Faxitron X-ray Corporation) at a dose rate of 1.48 Gy/min. S1P [(1  $\mu$ M) in PET vehicle (12); Biomol], Ly294002 (1  $\mu$ mol/L in DMSO; Biomol) and pertussis toxin (PTx; 100 ng/mL in H<sub>2</sub>O; Sigma) were respectively added 2, 2.5, and 3 hours before irradiation with low serum media (0.1% FBS).

#### **Clonogenic and cell counting assays**

For clonogenic studies, IEC-6 seeded at  $2.5 \times 10^3$  cells per 60-mm dish were treated with or without (w/o) S1P and irradiated at 2 to 15 Gy. After 2 weeks, colonies were scored after staining with 1% Giemsa. Apoptotic HMEC-1 and IEC-6 floating in the medium were counted as described (17).

#### Apoptosis by APO 2.7 and caspase 3/7 assays

Apoptosis was assessed using the APO2.7 marker as previously described (17). For the caspase 3/7 assay, proteins (50 µg) diluted in 32 µL of caspase buffer (Promega) were incubated with 250 µmol/L of Ac-DEVD-AMC. Peptide cleavage was measured every 15 minutes over 2 hours using a fluorescent plate reader (Dynatech) at excitation and emission wavelengths of 365 and 465 nm, respectively. Specific caspase activity was expressed in nanomoles of AMC released per microgram of proteins.

#### Studies on immune cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were maintained in RPMI-1640 medium. Cells were incubated w/o 1  $\mu mol/L$  of S1P 2 hours before irradiation.

Cells (5  $\times$  10<sup>5</sup>) harvested at different time points postirradiation were hybridized with amcyan-CD3 or APC-CD19 (BD), FITC-Annexin V (Beckman Coulter), and 7-AAD (BD) and then processed using a FACS Canto II system (BD). Data were analyzed with FACS Diva 6.1 software (BD).

#### Western blotting

After lysis, S1P- and/or PTx-treated HMEC-1 proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to ImmobilonP membrane (Millipore). The membrane was hybridized with antibodies of interest diluted at 1/1,000 for phospho-AKT (clone 9271; Cell Signaling), 1/1,000 for total AKT (clone 9272; Cell Signaling), and 1/2,500 for actin (Santa Cruz).

#### Animal, irradiation, and drug protocols

Eight- to 12-week-old C57Bl/6 male mice (Charles River) were housed in our animal core facility according to ongoing national regulations issues by INSERM and the French Department of Agriculture. Whole-body irradiation (WBR) was delivered with a <sup>60</sup>Co irradiator (Atomic Energy Canada) at 1 Gy/min. BM transplantation was carried out as described (19). After defining the maximum tolerated dose (MTD), 100  $\mu$ g/25 g mouse of S1P in 0.2 mL of PET was injected intravenously in mice 30 minutes prior to and 5 minutes after irradiation. PTx (1  $\mu$ g/25 g mouse) into 0.2 mL Hank's solution was injected intraperitoneally 2 hours and 30 minutes prior to, as well as 5 minutes and 2 hours, postirradiation. After defining the MTD, 10  $\mu$ g/25 g mouse of AKT inhibitor XI (AKTi; Merck) in 0.2 mL of water was injected intravenously in mice 30 minutes prior to and 5 minutes after irradiation.

#### Mice survival, leukocytes counting, and cause of death

Actuarial survival was calculated by the Kaplan–Meier product limit method. Leukopenia was measured using hematology analyzer (Melet-Schloesing) after harvesting peripheral blood from irradiated and/or S1P-treated mice. Causes of death were evaluated by autopsy (1). Five-micrometer sections of duodenal and femoral segments from terminally ill animals were stained with hematoxylin/eosin (H&E). GI damage and BM aplasia were diagnosed when the small intestines displayed denuded mucosa with no villus and no apparent crypts and the marrow showed complete depletion of hematopoietic elements, respectively.

#### Crypt survival assay and epithelial cell death

Crypt survival assay (crypt colony count) was carried out on proximal duodenum harvested 3.5 days after irradiation as described (20). Surviving crypts per intestines cross section were defined as containing at least 10 adjacent chromophilic cells and 1 Paneth cell, as well as a lumen. Ten circumferences scored in 4 mice were used to generate each data point. Assessment of crypt epithelial cell death on small intestines harvested 24 hours after irradiation was done as described (3). Dead crypt cells, characterized by abnormal nucleus and/or appearance of micronuclei, were counted in 150 crypts scored in 4 mice.

#### Immunohistology

Endothelial apoptosis was assessed in 5-µm intestines sections by FITC- or peroxydase-labeled TUNEL, as previously described protocol (1). Apoptotic cells were counted as described (1). Phospho-AKT (736E11; Cell Signaling) and FITC-CD31 antibodies (MEC13.3; BD Biosciences) at 1/50 and 1/200 dilution, respectively, were incubated overnight at 4°C after antigen was released by microwave heating in 0.1N citrate solution. Phospho-AKT was detected after hybridization with rhodamine-conjugated anti-rabbit antibody (BioSys), diluted at 1/200. Slides counterstained with 0.1  $\mu$ mol/L of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) were examined by standard (Axiovert 200; Carl Zeiss) or confocal (Leica) microscopy for colocalization studies.

#### Statistical analysis

Statistical analyses, the Student t test (95% confidence interval), and the Mantel log-rank test for survival were conducted using StatView 6.0.

### **Results**

#### S1P rescues mice from radiation-induced GI syndrome

The ability of S1P to protect mice from radiation-induced death was estimated by overall survival. WBR of 15 Gy killed 100% of C57Bl/6 mice within 7 days, with a median survival time of 5 days (Fig. 1A). Two retro-orbital injections of S1P delayed significantly animal death by 4 days (median survival time of 9 days; P < 0.01 vs. 15 Gy). Autopsies on agonal animal, which died 5 days after exposure to 15 Gy, showed severe GI damage (e.g., GI syndrome), characterized by an absence of crypt/villus units and an inflamed but preserved BM (Fig. 1B). Contrastingly, autopsies of S1P-treated mouse, which died 9 days after irradiation, suffered from BM depletion whereas intestinal villi and crypts were preserved. Irradiated animals died from BM aplasia after S1P-injection instead of GI syndrome after sham treatment.

To determine the ability of S1P to inhibit intestinal apoptosis, TUNEL assays were done on duodenal sections from mice 4 hours after 15-Gy WBR w/o S1P (Fig. 1C). High amount of apoptotic cells (brown staining) was observed within the lamina propria from irradiated mice but not in the epithelium monolayer. S1P pretreatment inhibited radiation damage by reducing the amount of apoptotic cells within the lamina propria. Staining for FITC-TUNEL (green) and rhodamine-CD31 (red) in intestinal sections from 15 Gy-irradiated mice revealed colocalization of apoptotic and endothelial markers as shown by the yellow staining on the merged image (Fig. 1D). CD31, but not the TUNEL, remained visible in intestinal sections from S1P-treated and irradiated mice. S1P inhibited endothelial cell apoptosis compared with sham-irradiated condition (mean of endothelial cell apoptosis per villus ±SEM 11.3±0.8% after 15 Gy vs. 3.7±0.5% after 15 Gy+S1P; Fig. 1E) and dramatically reduced the percentage of severely damaged villi containing more than 20 apoptotic cells (23.4% after 15 Gy vs. 1.3% after 15 Gy FITC + FITC S1P).

# S1P enhances crypt radioprotection but not *in vitro* epithelial cell radioresistance

To better define cellular mode of action of S1P in GI syndrome protection, crypt survival assay was conducted in mice 3.5 days after S1P treatment and exposure to a range of

ionizing radiation dose. The number of crypts per duodenal circumference sections decreased in a dose-dependent manner (Fig. 2A). After 15 Gy, less than 1 crypt per circumference was quantifiable (0.6  $\pm$  0.3%). S1P pretreament dramatically enhanced crypt survival ( $3.5 \pm 1.4\%$ ; P < 0.01 vs. 15 Gy), reaching an isoeffect close to 13 Gy + vehicle. Crypt radioprotection by S1P was confirmed by the fact that number of epithelial mitotic catastrophy per crypt decreased in S1Ptreated mice (2.3  $\pm$  0.1 24 hours after 15 Gy vs. 1.3  $\pm$  0.1 after 15 Gy + S1P; P < 0.01; Fig. 2B). However, neither clonogenic survival nor early radioprotection was enhanced in vitro by S1P treatment of 15 Gy-irradiated IEC-6 primary epithelial cells as supported by the 50% of clonogenic survival ( $DL_{50}$  of 3.2 and 4.2 Gy for vehicle- and S1P-treated groups, respectively; Fig. 2C) and by apoptosis (Fig. 2D; P > 0.1 S1P vs. sham treatment at 24 and 48 hours postirradiation).

# BM and lymphoid compartments are not protected by S1P after irradiation

WBR induces BM aplasia with severe leukopenia. The ability of S1P to protect lymphoid cells from radiation-induced death has been investigated using human PBMCs. Using multiparametric FACS analysis with amcyan-CD3, FITC-Annexin V, and 7-AAD (Fig. 3A), we showed that radiation-induced death increased similarly in T lymphocytes treated w/o S1P in a time-dependent manner (72 hours: 50.5  $\pm$  13.4% after 15 Gy and  $47.3 \pm 7.3\%$  after 15 Gy + S1P; P > 0.1; Fig. 3B). FACS analysis with APC-CD19, FITC-Annexin V, and 7-AAD (Fig. 3C) showed that B lymphocytes were more radiosensitive than T lymphocytes; however, no specific protection by S1P pretreament was observed (24 hours: 57  $\pm$  10% after 15 Gy and 58.3  $\pm$  10.5% after 15 Gy + S1P; *P* > 0.1; Fig. 3D). To confirm the lack of radioprotection on hematopoietic cells by S1P, leukocytes were counted directly in irradiated mice on a daily basis. A slightly increase in the number of white blood cells was observed in sham-irradiated mice; however, leukocyte counts in irradiated mice were shown to decrease dramatically in a time-dependent manner, regardless of S1P treatment (day 4:  $0.2 \pm 0.1\%$  after 15 Gy vs.  $0.2 \pm 0.1\%$  after 15 Gy + S1P; P > 0.1; Fig. 3E). Agonal mice treated with 15 Gy + S1P presented severe leukopenia and BM aplasia. Autologous BM transplantation 16 hours after 15 Gy WBR and S1P treatment definitely explained the demise of the animals. If 15 Gy + BM-treatedmice and 15 Gy-irradiated mice died within the time frame (median survival: 5 days after 15 Gy; 6 days after 15 Gy + BM; P > 0.1); however, cotreatment with S1P + BM increased survival of irradiated mice. Half of S1P- and BM-treated mice stayed alive 100 days postirradiation (median survival time: 9 days after 15 Gy + S1P; >100 days after 15 Gy + S1P + BM; P < 0.01). Surviving mice exhibited normal activity without any gross dysfunction, except fur depigmentation due to irradiation, until death that occurred suddenly 4 months postirradiation.

# S1P-mediated radioprotection acts through the extracellular pathway

To validate our hypothesis that G-coupled protein receptors play a role for in the S1P-mediated endothelial



Figure 1. S1P treatment rescues from endothelial cell apoptosisinduced death mediated by high dose of radiation. A, survival curves of PET- or S1P-treated mice after 15-Gy WBR. Number in parentheses indicates animals per group. B, H&E-stained sections of proximal duodenum and femur from agonal animals after 15 Gy w/o S1P. Number in parentheses indicates the day postexposure to radiation when tissues have been harvested from the agonal animals. Scale bar, 250 µm. C, apoptosis in duodenum 4 hours after 15 Gy w/o S1P. Apoptosis was evaluated by peroxidase-TUNEL (brown) counterstained with hematoxylin (blue). Scale bar, 100 um. D. colocalization between apoptotic FITC-TUNEL (green) and endothelial rhodamine-CD31 (red) shown by the yellow staining on the merge image and counterstained with DAPI (blue). Scale bar, large picture 60 µm, window 30 µm. E, apoptotic cell distribution by crypt/villus unit in duodenum after 15 Gy w/o S1P.

radioprotection, HMEC-1 were treated with PTx, which caused the uncoupling of Gi proteins from the S1P receptors, before treatment with S1P and exposure to 15 Gy. Radiationinduced death was inhibited by S1P (32.7  $\pm$  6.3% after 15 Gy vs. 13.6  $\pm$  2.6% after 15 Gy + S1P; P = 0.01; Fig. 4A); however, PTx treatment restored apoptosis in S1P-treated endothelial cells to the level observed with exposure to 15 Gy alone (23.4  $\pm$  4.4% after 15 Gy + PTx + S1P, P > 0.1 vs. 15 Gy). Moreover, treatment with PTx alone did not modulate HMEC-1 radiosensitivity (28.6  $\pm$  5.4%, P > 0.1 vs. 15 Gy), which suggests a direct inhibition of the S1P survival pathway. Inhibition of S1P-induced endothelial cell survival by PTx was confirmed by APO2.7 FACS analysis (Fig. 4B) and by a DEVDase assay (Fig. 4C). We then tested whether endothelial cell survival in the small intestines was enhanced by S1P through an extracellular mechanism (Fig. 4D). Injection of PTx prior to a 15-Gy WBR did not modify mice survival as compared with that of sham-irradiated mice. However, PTx restored the radiosensitivity pattern in mice pretreated with S1P (median survival time: 8 days after 15 Gy + S1P and 5 days after 15 Gy + PTx + S1P; P < 0.02) and caused animals to die from GI syndrome in PTx- and S1P-treated mice instead of BM aplasia in the S1P-treated cohort (Fig. 4E). As determined by the TUNEL assay, PTx restored apoptotic cell pattern (green fluorescence) within the small intestines of S1P-treated and irradiated mice (Fig. 4F).

# AKT phosphorylation is necessary in S1P-mediated intestinal radioprotection

AKT phosphorylation activates a robust survival signal that inhibits endothelial cell apoptosis. Western blot from S1P-treated HMEC-1 confirmed AKT phosphorylation

Figure 2. S1P does not protect intestinal epithelial cell from radiation exposure. A, crypt survival assav on transverse cross-section slides from duodenum harvested 3.5 days after WBR between 2 and 15 Gy w/o S1P. Surviving crypts for 10 H&E-stained circumferences (mean  $\pm$  SD, n = 4, \*, P < 0.01). B, dead epithelial cells per crypt for 150 duodenal crypts 24 hours after 15 Gy (mean  $\pm$  EM, n = 3, \* P < 0.01). C, clonogenic assay of vehicle- or S1P-treated IEC-6 before irradiation between 2 and 15 Gy. Irradiated clonogenic fraction was normalized to the nonirradiated clonogenic fraction (mean + SEM: n = 3 in duplicate. P > 0.1). D, death estimated by apoptotic floating cell counts in 15 Gy-irradiated IEC-6 treated w/o S1P (mean  $\pm$  SD; n = 3 in triplicate); ns, nonsignificant difference.



within 15 minutes (Fig. 5A), which was inhibited by PTx pretreatment. These results were also confirmed in vivo. Pretreatment with S1P, but not S1P + PTx, induced AKT phosphorylation in mice within 15 minutes, specifically within the lamina propria (Fig. 5B). Colocalization of rhodamine-a-phospho-AKT (red) and FITC-CD31 (green) into intestinal cross sections of S1P-treated mice, as shown by the vellow stain of the merged image (Fig. 5C), proves that S1P specifically induced AKT activation in the endothelial cells. To show the key role of AKT activation in S1P-mediated endothelial survival, HMEC-1 cells were pretreated with LY290004 prior to S1P treatment and 15-Gy exposure. PI3K inhibitor alone did not modulate HMEC-1 sensitivity (27  $\pm$  6% after 15 Gy + LY290004 vs.  $23.1 \pm 3.4\%$  after 15 Gy; *P* > 0.1; Fig. 6A); however, LY290004 inhibited S1P-mediated radioprotection (23.8  $\pm$  6.5% after 15 Gy+ S1P + LY290004 vs. 14.5  $\pm$  1.1% after 15 Gy + S1P; P < 0.1). Inhibition of S1P-induced radioprotection by LY290004 was confirmed by APO2.7 FACS analysis (Fig. 6B). We then tested the ability of AKT inhibition to reverse radioprotection in our murine GI syndrome model. Pharmacologic action of water-soluble AKTi was proven by disappearance of rhodamine staining for phospho-AKT, detectable within the intestines of S1P-treated mice (Fig. 6C). Injection of AKTi did not modify mice survival as compared with sham-irradiated mice (Fig. 6D) but reduced survival time of S1P-treated and

irradiated mice (median survival time: S1P = 8 days; AKTi + S1P = 6 days; P < 0.01). As expected, animals died from GI syndrome in AKTi- and S1P-treated mice instead of BM aplasia in the S1P-treated cohort (Fig. 6E).

#### Discussion

Recent studies have shed new light on the critical role of the microvasculature in the regulation of tissue response to stresses. Endothelial cell apoptosis is initiated by activation/relocalization of ASM-inducing ceramide generation leading to caspase activation. S1P, a ceramide antagonist, can protect quiescent endothelial cells in culture from radiation-induced apoptosis (17). In the present study, we establish S1P as a new, relevant, bioactive lipid acting to prevent endothelial apoptosis and acute organ necrosis in radiation-induced GI syndrome.

Very recently, the role of endothelial cell apoptosis in the pathogenesis of GI syndrome has been challenged. Mice selectively deleted not only for the apoptotic *bax* gene in hematopoietic and endothelial cells through Tie2Cre-loxP system but also for the apoptotic *bak1* gene in their whole genome (Tie2Cre;*bak1<sup>-/-</sup>;bax<sup>FL/-</sup>*) were not shown as more resistant to high dose radiation than the control (*bak1<sup>-/-</sup>; bax<sup>+/+</sup>*) mice. Unfortunately, invalidation of *bak1* in mice



Figure 3. S1P does not reduce hematopoietic radiation toxicity. A, 1 of the 3 experiments showing alive (gray) and apoptotic (dark) T lymphocytes 48 hours after 15 Gy w/o S1P. T lymphocytes were detected by FACS with amcyan, apoptosis with FITC-Annexin V, and the whole-cell population with 7-AAD. B, percentage of CD3positive apoptotic cells after 15 Gy w/o S1P (mean  $\pm$  SD, n = 3). C, 1 of the 3 experiments showing alive (gray) and apoptotic (dark) B lymphocytes after 15 Gy w/o S1P. Condition and staining are similar to A except APC-CD19 for B lymphocytes instead of CD3. D, amount of CD19-positive apoptotic cells after 15 Gy w/o S1P (mean  $\pm$  SD, n = 3). E, leukocytes counts in 15 Gyirradiated and S1P-treated mice (mean ± SEM, n = 3, \*, P < 0.01 vs. sham-treated mice). F, survival curves of S1P-treated and/or BMtransplanted mice after 15 Gy. Number in parentheses indicates animals/group.

inhibits endothelial cell apoptosis within the intestinal villi (mean apoptosis: 1.6% after 16.95 Gy; ref. 21) as compared with those from irradiated wild-type mice observed by us (11.3 ± 0.3% in wild-type mice after 15 Gy) and others (5, 6, 22), which proves that Tie2Cre;*bak1<sup>-/-</sup>;bax<sup>FL/-</sup>* mouse model is not appropriate to evaluate BAX-mediated endothelial cell apoptosis and its association to the GI syndrome. Contrastingly, the present study shows reduced endothelial cell apoptosis within villi from S1P-treated mice after 15 Gy WBR (3.7 ± 0.5%) at a level comparable with that observed after bFGF treatment at the same dose (3.2 ± 0.4%; personal data). This inhibition of endothelial cell apoptosis by S1P is correlated with the prevention of the GI syndrome, which provides another proof of the crucial role

of endothelial apoptosis in intestinal necrosis, crypt shrinkage, and GI syndrome.

Despite an enhancement of crypt survival and an inhibition of crypt epithelial cell mitotic catastrophy by S1P (Fig. 2A and B), direct protection of irradiated epithelial cells by S1P seems to be excluded according to our *in vitro* studies using IEC-6 cells (Fig. 2C and D), as well as transformed intestinal T84, colonic tumor Caco2, and HCT116 epithelial cell lines (data not shown). As already described in a coculture model, irradiation of HMVEC endothelial cells in the presence of nonirradiated T84 epithelial cells induces mitotic arrest and apoptosis of the epithelial layer (23). Blocking radiation-induced endothelial cell apoptosis with S1P protects the epithelial compartment indirectly. Alternately, lisophosphatidic acid (LPA), a lipid



Figure 4. PTx pretreatment inhibits S1P-induced endothelial cell survival and small intestinal radioprotection. A-C, evaluation of apoptosis in PTxand/or S1P-treated HMEC-1 24 hours after 15 Gy: (A) by floating cell count (mean  $\pm$  SD; n = 3), (B) by APO2.7 analysis (n = 3, 1 representative FACS)analysis), and (C) by DEVDase assay (n = 3, 1 representative assay). D, survival curves of S1Pand/or PTx-treated mice after 15 Gy. Number in parentheses indicates animals/group. E, H&Estained duodenum from agonal mice after 15 Gy w/o PTx and S1P. Scale bar, 200 µm. F, apoptosis using FITC-TUNEL (green) and DAPI (blue) in duodenal sections from 15 Gyirradiated and/or PTx- and S1Ptreated mice. Scale bar, large picture 60 µm, window 30 µm.

functionally related to S1P, protects IEC-6 cells from radiationinduced death (24). Radiation-induced endothelial cell apoptosis and the GI syndrome were not inhibited by LPA or dihydrosphingosine-1-phosphate despite their capacity to bind to S1P receptors with a low affinity (Supplementary Fig. S1). The discrepancy of S1P radioprotection observed between the endothelium and the epithelium may be explained by the difference in cell death mechanisms. Endothelial cells die rapidly by a ceramide-dependent apoptosis, whereas epithelial cells are more subject to delayed mitotic death (25).

The GI syndrome is mainly related to endothelial and epithelial dysfunctions, whereas BM aplasia is triggered by the death of hematopoietic stem cell. Binding of extracellular S1P to its receptors has been reported to enhance trafficking of T and B lymphocytes in the lymphoid system as well as their migration in nonimmune tissues (26). T and B lymphocytes were sensitive to radiation in a time-dependent manner, with no protection by S1P pretreatment (Fig. 3), which proves a lack of molecular redundancy in the S1P-mediated immune cell maturation and survival processes. Blood counts and histology of agonal mice show a lack of protection by S1P from radiation-induced leukopenia and BM aplasia, respectively. This was confirmed by the fact that mice injected with S1P and irradiated at 15 Gy were protected for more than 4 months by transplantation of fresh nonirradiated BM 16 hours postirradiation.

The present study sheds new light on the mechanism underlying S1P radioprotection, which was largely unknown.



Figure 5. PTx pretreatment inhibits in vitro and in vivo S1P-induced phospho-AKT. A, phospho-AKT expression by Western blotting in HMEC-1-treated w/o PTx for 45 minutes and/or S1P for 15 minutes (n = 3, 1 representative blot). B, phospho-AKT immunostaining (red) and DAPI (blue) of duodenal sections from PTx- and/or S1P-treated mice. Scale bar, large picture 60 µm, window 30 µm. C, colocalization of the FITC-CD31 endothelial marker (green) and phospho-AKT (red) is shown by the vellow staining on the merge image. Scale bar, 10 µm.

S1P protection of oocytes from radiation- and doxorubicininduced death (12, 19) was not inhibited by PTx, arguing for a, S1P-dependent intracellular protective pathway, at least in oocytes. Either intra- or extracellular S1P pathways have been considered to be involved in survival signaling in endothelial cells. Serum starvation-induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) death is enhanced by inhibiting either the extracellular pathway through PTx treatment (27) or the intracellular pathway through overexpression of sphingosine kinase 1 (28). Our data support the involvement of the extracellular pathway in both in vitro and in vivo S1Pinduced endothelial cell radioprotection (Fig. 4). S1P protection of endothelial cell apoptosis detected by APO2.7 in HMEC-1 or directly within the lamina propria was reversed by PTx pretreatment. Extracellular S1P has not been directly studied in vivo but has been indirectly investigated through the use of related agonist/antagonist to S1P receptors. The most studied drug is FTY720, a synthetic myriocin analogue that acts as a functional antagonist by internalizing S1P1 receptors, which are then degraded by the proteosome (29). FTY720 prevents S1P-mediated biological functions in HUVEC such as tumor angiogenesis and  $Ca^{2+}$  mobilization (30). Endothelial apoptosis has not been examined after the treatment with FTY720; however, knocking out the S1P1 or S1P3 receptors, using an antisense strategy, reverses S1P protection against serum deprivation-induced HUVEC death (16). Further investigations using S1P receptor transgenic models or specific inhibitors will better define mode of action of the S1P as a survival signal.

The PI3K/AKT couple is considered as a robust prosurvival mediator enforcing endothelial cell integrity (31). S1P

pretreatment of mice specifically induced AKT phosphorylation in endothelial cells within the lamina propria but not in the epithelial layer. Furthermore, in vitro and in vivo studies showed that AKT phosphorylation is under the control of the extracellular S1P pathway, as shown by the inhibition of S1P-induced phospho-AKT by PTx pretreatment (Fig. 5). The fact that pharmacologic inactivation of phospho-AKT blocked S1P-induced protection of the small intestines after irradiation (Fig. 6) strongly supports the hypothesis that the endothelial compartment plays a crucial role in the regulation of the fate of the small intestines after exposure to ionizing radiation. Recently, treatments with insulin growth factor-1 (IGF-1) and bFGF have been shown to activate AKT phosphorylation in crypt columnar cells and inhibit PUMA and p53-mediated GI damage (32). Because S1P receptors are expressed in the intestinal epithelial mucosa (personal data), we cannot exclude the fact that S1P activate AKT in crypt epithelial stem cells. However, no crypts or epithelial cells were shown to be positive for phospho-AKT staining in S1P-treated mice. This apparent discrepancy may be due to the kinetics of AKT phosphorylation. Although S1P induces phosphorylation in endothelial cells within 15 minutes, AKT is activated in crypt columnar cells 4 hours after IGF-1 and bFGF treatment. Different pharmacologic strategies succeeded in inhibiting AKT activation and enhancing tumor endothelial cell radiosensitivity (33), with no observation on normal tissue radiotoxicity. In our study, the fact that phospho-AKT staining was untraceable in small intestine sections from untreated mice and AKTi treatment did not modulate death of 15 Gy-irradiated mice could be considered as a first proof



**Figure 6.** AKTi inhibits S1P-induced endothelial cell survival and small intestines radioprotection. A and B, evaluation of apoptosis in Ly294002- and/or S1P-treated HMEC-1 24 hours after 15 Gy: (A) by floating cell count (mean  $\pm$  SD; n = 3) and (B) by APO2.7 analysis (n = 3, one representative FACS analysis). C, phospho-AKT immunostaining (red) and DAPI (blue) of duodenal sections treated w/o AKTi and S1P. Scale bar, large picture 60 µm, window 30 µm. D, survival curves of S1P- and/or AKTi-treated mice after 15 Gy. Number in parentheses indicates animals/group. E, H&E-stained duodenum from agonal mice after 15 Gy w/o AKTi and S1P. Scale bar, 250 µm.

of the specificity of the AKT inhibition strategy in tumor but not in normal tissue endothelium.

In conclusion, we showed that S1P is a relevant bioactive lipid that can inhibit the GI syndrome through the promotion of endothelial cell survival. S1P is known for its pleiotropic roles in biological functions, such as proliferation, adhesion, inhibition of permeability, and lymphocyte maturation. Additional studies, either on the pharmacologic modulation of sphingosine kinase or sphingosine lyase activity, which changes the intracellular levels of S1P, or on the characterization of the S1P receptor(s) involved in the survival signal transduction cascade, are necessary to better define a class of drugs conferring endothelial protection with few side effects.

#### **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### References

- Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. Science 2001;293:293–7.
- Potten CS, Owen G, Roberts SA. The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. Int J Radiat Biol 1990;57:185–99.
- Pritchard DM, Potten CS, Korsmeyer SJ, Roberts S, Hickman JA. Damage-induced apoptosis in intestinal epithelia from bcl-2-null and bax-null mice: Investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis *in vivo*. Oncogene 1999;18:7287–93.
- Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, Strom E, Gleiberman AS, Gupta D, et al. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. Science 2008;320: 226–30.
- Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, Steinmetz MO, Ryu YS, Lee SH, et al. COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101: 5547–52.
- Rotolo JA, Maj JG, Feldman R, Ren D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, et al. Bax and Bak do not exhibit functional redundancy in mediating radiation-induced endothelial apoptosis in the intestinal mucosa. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008;70:804– 15.
- Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, Shimokado K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. J Biol Chem.1998;273:9681–7.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. Nature 1996;381:800–3.
- Igarashi J, Michel T. Sphingosine 1-phosphate and isoformspecific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways. J Biol Chem 2001;276: 36281–8.
- Xia P, Wang L, Gamble JR, Vadas MA. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells. J Biol Chem 1999;274:34499–505.
- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, et al. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G proteincoupled receptor EDG-1. Science 1998;279:1552–5.
- Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. Nat Med 2000;6:1109–14.
- 13. Sun X, Shikata Y, Wang L, Ohmori K, Watanabe N, Wada J, et al. Enhanced interaction between focal adhesion and adherens junction proteins: involvement in sphingosine 1-phosphate-induced endothelial barrier enhancement. Microvasc Res 2009;77:304– 13.
- Moriue T, Igarashi J, Yoneda K, Nakai K, Kosaka H, Kubota Y. Sphingosine 1-phosphate attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2008;368: 852–7.
- Zheng DM, Kitamura T, Ikejima K, Enomoto N, Yamashina S, Suzuki S, et al. Sphingosine 1-phosphate protects rat liver sinusoidal endothelial cells from ethanol-induced apoptosis: role of intracellular calcium and nitric oxide. Hepatology 2006;44:1278–87.

#### Grant Support

Electricité de France, La Ligue Nationale Contre le Cancer, Association pour la recherche sur le Cancer, and Institut National du Cancer.

Received 06/07/2010; revised 08/23/2010; accepted 09/16/2009; published OnlineFirst 11/30/2010.

- Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. Sphingosine 1phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. J Biol Chem 2001;276:10627–33.
- Bonnaud S, Niaudet C, Pottier G, Gaugler MH, Millour J, Barbet J, et al. Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. Cancer Res 2007;67:1803–11.
- Greenspon J, Li R, Xiao L, Rao JN, Marasa BS, Strauch ED, et al. Sphingosine-1-phosphate protects intestinal epithelial cells from apoptosis through the Akt signaling pathway. Dig Dis Sci 2009;54:499–510.
- Paris F, Perez GI, Fuks Z, Hamovitz-Friedman A, Nguyen H, Bose M, et al. Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. Nat Med 2002;8:901–2.
- Withers HR, Elkind MM. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 1970;17:261–7.
- Kirsch DG, Santiago PM, di Tomaso E, Sullivan JM, Hou WS, Dayton T, et al. p53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis. Science 2010;327: 593–6.
- 22. Qiu W, Carson-Walter EB, Liu H, Epperly M, Greenberger JS, Zambetti GP, et al. PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. Cell Stem Cell 2008;2: 576–83.
- Gaugler MH, Neunlist M, Bonnaud S, Aubert P, Benderitter M, Paris F. Intestinal epithelial cell dysfunction is mediated by an endothelialspecific radiation-induced bystander effect. Radiat Res 2007;167: 185–93.
- Deng W, Balazs L, Wang DA, Van Middlesworth L, Tigyi G, Johnson LR. Lysophosphatidic acid protects and rescues intestinal epithelial cells from radiation- and chemotherapy-induced apoptosis. Gastroenterology 2002;123:206–16.
- Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. Oncogene 1997;14:2759–66.
- Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. Nat Rev Immunol 2005;5: 560–70.
- 27. Kimura T, Sato K, Kuwabara A, Tomura H, Ishiwara M, Kobayashi I, et al. Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. J Biol Chem 2001;276: 31780–5.
- 28. Limaye V, Li X, Hahn C, Xia P, Berndt MC, Vadas MA, et al. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. Blood 2005;105:3169–77.
- Oo ML, Thangada S, Wu MT, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, et al. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. J Biol Chem 2007;282: 9082–9.
- LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C, O'Reilly T, Wyder L, Sanchez T, et al. Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors

by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. Cancer Res 2006;66:221–31.

- Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. Circ Res 2002;90:1243–50.
- 32. Qiu W, Leibowitz B, Zhang L, Yu J. Growth factors protect intestinal stem cells from radiation-induced apoptosis by suppressing

PUMA through the PI3K/AKT/p53 axis. Oncogene 2010;29: 1622-32.

 Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, Hallahan DE. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. Cancer Res 2002;62: 4671–7.