

Université de Montréal

**Caractérisation structurale de la molécule HLA-DO**

Par

Nicola Raby

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du  
grade de Maître ès sciences (M.SC.) en microbiologie et immunologie

Février 2009

© Nicola Raby, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Caractérisation structurale de la molécule HLA-DO**

Présenté par  
Nicola Raby

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Louis de Repentigny

Président-rapporteur

Dr Jacques Thibodeau

Directeur de recherche

Dr Nathalie Labrecque

Membre du jury

## RÉSUMÉ

Les molécules classiques du CMH de classe II présentent des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4+. Cette présentation est régulée par deux molécules non classiques : HLA-DM catalyse la relâche de CLIP et le chargement de peptides et HLA-DO module l'activité de DM. Une expression insuffisante en cellules d'insectes empêche les expériences de cristallisation de DO, probablement en raison de sa conformation, rendant DO instable et inapte à sortir du réticulum endoplasmique (RE). DM corrige la conformation de DO et permet sa sortie du RE. Aussi, par ses ponts disulfures uniques, DM adopte une conformation stable et peut sortir du RE sans lier d'autre molécule. Nous avons tenté de corriger la conformation de DO en introduisant des cystéines pour établir des ponts homologues à ceux de DM. La conformation de DO ne fut pas corrigée. Par ailleurs, nous avons augmenté l'expression de DO en introduisant une séquence partielle de Kozak. Nous avons aussi étudié l'effet de DM sur l'expression de DO. DM a favorisé l'expression de DO, probablement en diminuant sa dégradation.

Chaque chaîne du dimère DM $\alpha\beta$  est impliquée dans l'oxydation de sa chaîne partenaire. La conformation non-optimale de DO pourrait traduire une incapacité des chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  à favoriser l'oxydation de sa partenaire; DM corrigerait ce problème. Notre analyse d'immunobuvardage de type Western a toutefois démontré que DM ne modifie pas l'état d'oxydation de DO $\alpha$  et DO $\beta$ .

Finalement, nous avons étudié l'interaction DO-DM. L'acide aminé DO $\alpha$ E41 est impliqué dans cette liaison. Certains des acides aminés entre  $\alpha$ 80 et  $\alpha$ 84 pourraient être impliqués. Nous avons muté des acides aminés de cette région de DO $\alpha$ . Les résidus testés ne semblent pas impliqués dans la liaison DO-DM.

L'obtention de la structure tridimensionnelle de DO et la caractérisation de son état oxydatif et de sa liaison à DM permettront de mieux comprendre son rôle.

## MOTS CLÉS

Conformation

CMH II

HLA-DM

HLA-DO

Oxydation

Présentation antigénique

Structure

## ABSTRACT

Classical MHC class II molecules present antigenic peptides to CD4<sup>+</sup> T cells. This presentation is regulated by two non-classical molecules: HLA-DM catalyzes CLIP release and peptide loading and HLA-DO mediates the DM activity. An insufficient expression in insect cells did not allow DO crystal production experiments, probably because of its conformation, rendering DO unstable and unable to leave the endoplasmic reticulum (ER). DM corrects the conformation of DO and allows its egress from the ER. Also, because of its unique disulfide bonds, DM has a stable conformation and can egress from the ER without binding another molecule. We tried to correct the conformation of DO by introducing cysteines to create disulfide bonds homologous to those of DM. However, its conformation was not corrected. Also, we increased DO expression by inserting a partial Kozak sequence. We also studied the effect of DM on DO expression. DM favoured DO expression, probably by reducing its degradation.

Each chain of the DM $\alpha\beta$  dimer plays a role in the oxidation of its partner chain. The non-optimal conformation of DO might result from an incapacity of its  $\alpha$  and  $\beta$  chains to direct each other's oxidation; DM would correct this problem. Our Western blot analysis showed, however, that DM does not modify the oxidation state of DO $\alpha$  and DO $\beta$ .

Finally, we studied the DO-DM interaction. The DO $\alpha$ E41 amino acid is involved in this interaction, as some of the  $\alpha$ 80 to  $\alpha$ 84 might be. We mutated amino acids in this region of DO. Tested amino acids did not seem involved in DO-DM binding.

The tridimensional structure of DO and the characterization of its oxidative state and its DM binding will allow a better understanding of its function.

## KEY WORDS

Conformation

MHC II

HLA-DM

HLA-DO

Oxydation

Antigen presentation

Structure



1.3.1.4	Fonction de DM .....	18
1.3.1.5	Association avec DR.....	20
1.3.2	HLA-DO .....	20
1.3.2.1	Structure de DO.....	23
1.3.2.2	Distribution cellulaire.....	24
1.3.2.3	Régulation de l'expression de DO .....	25
1.3.2.4	Sortie du RE et localisation.....	26
1.3.2.5	Liaison DO-DM .....	28
1.3.2.6	Fonction de DO .....	30
1.3.2.6.1	Modification du répertoire peptidique présenté.....	31
1.3.2.7	Importance de DO in vivo.....	32
1.3.2.8	Autres rôles de DO.....	33
1.4	Repliement général des protéines dans le RE.....	33
1.5	Objectifs et hypothèses de travail .....	35
<b>CHAPITRE 2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>		<b>38</b>
2.1	Stratégies de clonage et PCR.....	39
2.1.1	Stratégie de clonage des mutants cystéines .....	42
2.2	Transformation bactérienne .....	42
2.3	Lignées cellulaires et transfections.....	43
2.4	Anticorps .....	43
2.5	Cytométrie en flux.....	43
2.6	Lyse cellulaire, immunobuvardage de type Western et digestion à l'endoglycosidase H .....	44
<b>CHAPITRE 3 – RÉSULTATS.....</b>		<b>45</b>
3.1	Expression de DO .....	46
3.1.1	Optimisation de la traduction de DO .....	46
3.1.2	Stabilité de DO.....	48

3.2 Conformation de DO .....	49
3.2.1 Mutations de la chaîne DO $\alpha$ .....	50
3.2.2 Mutations de la chaîne DO $\beta$ .....	53
3.3 Niveau d'oxydation de DO .....	58
3.4 Liaison DO-DM .....	59
<b>CHAPITRE 4 – DISCUSSION</b> .....	<b>63</b>
4.1 Expression de DO .....	64
4.1.1 Augmentation de la traduction de DO .....	64
4.1.2 Stabilité de DO .....	65
4.1.3 Modification de la conformation de DO .....	66
4.2 État d'oxydation de DO .....	70
4.3 Rôle des chaperons dans la rétention de DO dans le RE .....	73
4.4 Interaction DO-DM .....	73
<b>CHAPITRE 5 - CONCLUSION</b> .....	<b>76</b>
<b>CHAPITRE 6 – BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>79</b>

## LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1

Figure 1.1	Présentation antigénique par une CPA à un lymphocyte T CD4 +.....	3
Figure 1.2	Voies de présentation des antigènes .....	4
Figure 1.3	Locus du complexe majeur d'histocompatibilité chez l'humain .....	6
Figure 1.4	Structure des molécules du CMH .....	8
Figure 1.5	Structure tridimensionnelle d'une molécule classique du CMH-II .....	9
Figure 1.6	Les peptides liant la niche peptidique ont une conformation similaire .....	10
Figure 1.7	Liaisons hydrogènes entre le peptide et des résidus de la niche Peptidique.....	11
Figure 1.8	Accommodement d'acides aminés par les pochettes de la niche peptidique .....	12
Figure 1.9	Dégradation de la chaîne invariante.....	14
Figure 1.10	Voie de transport endosomale des molécules du CMH de classe II.....	15
Figure 1.11	La structure de DM est semblable à celles des molécules classiques du CMH de classe II.....	18
Figure 1.12	Fonction de DM .....	19
Figure 1.13	DO possède une forte identité de séquence avec les molécules classiques du CMH de classe II.....	22
Figure 1.14	Encombrement stérique causé par la glycine en position 9 de la chaîne $\alpha$ de DQ2 .....	27
Figure 1.15	Modèle d'action de DO au niveau des différents compartiments endo-Lysosomaux.....	32
Figure 1.16	Emplacement des cystéines et ponts disulfures potentiels chez les molécules du CMH de classe II.....	35

## CHAPITRE 2

Figure 2.1	Carte de pBudCE4.1 ampi .....	39
Figure 2.2	Sites de multiclonaage de pBudCE4.1.....	42

## CHAPITRE 3

Figure 3.1 La séquence de Kozak partielle <i>acc</i> augmente l'expression de DO .....	47
Figure 3.2 Influence de DM sur l'expression totale de DO .....	49
Figure 3.3 Mutations obtenues sur la chaîne $\alpha$ de DO visant à stabiliser DO.....	51
Figure 3.4 La mutation Y14C/I64C de la chaîne DO $\alpha$ ne corrige pas la conformation de DO .....	53
Figure 3.5 Mutations obtenues sur la chaîne $\beta$ de DO visant à stabiliser DO.....	54
Figure 3.6 Les mutations F30C/Y37C et F30C/V38C de la chaîne DO $\beta$ ne corrigent pas la conformation de DO .....	56-57
Figure 3.7 Niveaux d'oxydations de DO.....	59
Figure 3.8 Les mutations DO $\beta$ R82A/I84T et I84V n'ont pas d'effet majeur sur la liaison DO-DM.....	61-62

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Liste complète des oligonucléotides utilisés pour les PCR.....	40
--	----

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique  
BCR : récepteur des cellules B  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CPA : cellule présentatrice d'antigènes  
CLIP : Class II associated invariant chain peptide  
CIITA: transactivateur de classe II (class II transactivator)  
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité  
CMH-I : CMH de classe I  
CMH-II: CMH de classe II  
DC : cellule dendritique  
DM :HLA-DM  
DMY: DM $\alpha$ wt/ $\beta$ Y226A  
DO : HLA-DO  
DP: HLA-DP  
DQ: HLA-DQ  
DR: HLA-DR  
EndoH : Endoglycosidase H  
FBS : sérum de bœuf fœtal  
GC : centre germinal  
HLA : human leukocyte antigen  
IFN- $\gamma$  : interféron gamma  
Ig : immunoglobuline  
Ii : chaîne invariante  
kDa : kilodalton  
MIIC : compartiments du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
MBP : myelin basic protein  
PCR : réaction en chaîne par polymérase

PFA : paraformaldéhyde

RE : réticulum endoplasmique

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS

## REMERCIEMENTS

Ma maîtrise et son aboutissement avec la rédaction de ce mémoire ont été rendus possibles grâce à l'apport de bien des gens. Tout d'abord, j'aimerais remercier Jacques Thibodeau, qui m'a donné la chance d'évoluer dans son laboratoire et qui sait faire face aux moments plus difficiles. Ensuite, merci à tous les membres du laboratoire, à Jean-Simon, Marie-Claude, Annie, Jessy, Laetitia, Mammad, Maryse, Fangming et Marie-Hélène, qui ont répondu à de nombreuses questions et se sont toujours montrés coopératifs et compréhensifs. Par ailleurs, chacun m'a aussi aidé à sa manière. Merci aux membres des laboratoires voisins, dont l'aide fut parfois requise.

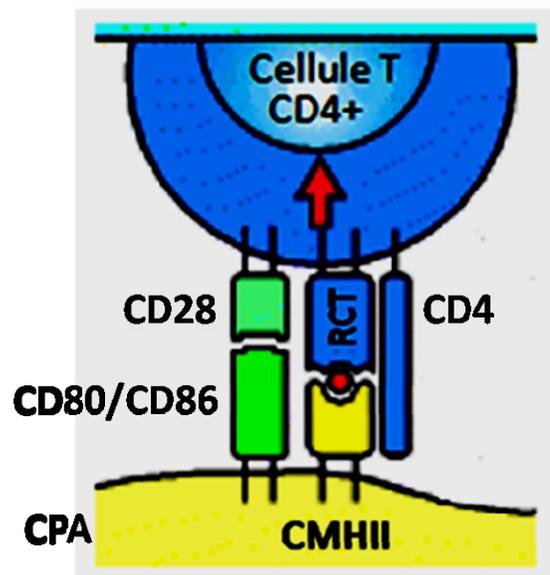
Merci mille fois à mon amour Annie, qui a été d'un support inouï et dont la présence a été plus que bénéfique. Merci de ne pas avoir trop parlé de ton travail de labo quand j'avais besoin de décompresser et de penser à tout sauf la science! Merci à mes parents Claire et Michel, mon frère Martin et mes amis. Vous m'avez encouragé et insufflé une dose d'optimisme et, surtout, avez contribué à faire de moi la personne que je suis, pour le meilleur et pour le pire. Merci à tout mon entourage.

Merci à ceux qui on fait ou font avancer la science. Merci à tous ceux qui ont jeté un œil à ce mémoire.

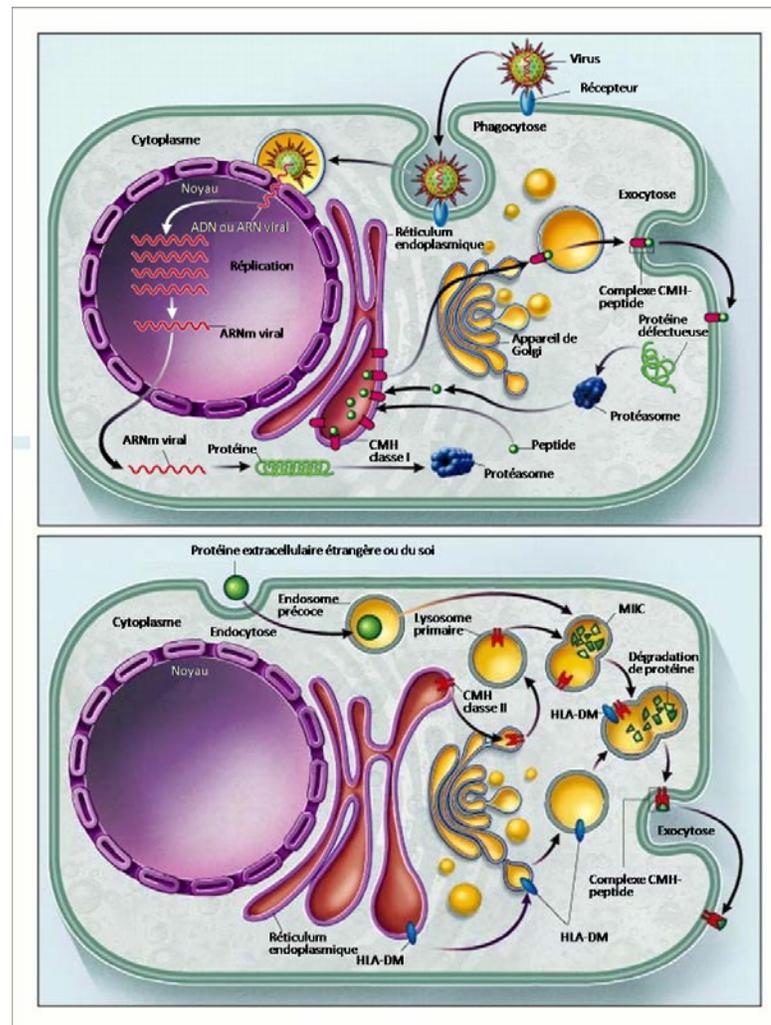
CHAPITRE 1  
REVUE DE LA LITTÉRATURE

## 1.1 Introduction

Pour combattre les infections, les corps étrangers doivent être reconnus par les cellules du système immunitaire afin d'induire la réponse immunitaire appropriée. La présentation antigénique est un élément essentiel du système immunitaire. Elle permet de distinguer le soi du non-soi et d'activer les cellules pouvant reconnaître spécifiquement un pathogène donné. Les antigènes étrangers sont dégradés en peptides qui sont présentés aux lymphocytes T par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). On retrouve les molécules du CMH de classe I (CMH-I) chez la quasi-totalité des cellules du corps. Elles sont impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire (1). Elles présentent les peptides issus de la voie endogène aux cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (2), pour que ces dernières provoquent la mort des cellules infectées. Quant aux molécules du CMH de classe II (CMH-II), elles sont réservées à un nombre plus restreint de cellules, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les principales CPA sont les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages. Des CPA non-professionnelles peuvent être induites à exprimer le CHM-II par la stimulation à l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ). Parmi celles-ci, on retrouve entre autres les fibroblastes de la peau, les cellules épithéliales thymiques et les cellules épithéliales thyroïdiennes (3). Les CPA activent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (**figure 1.1**) et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activeront la branche de l'immunité à médiation humorale, bien qu'ils puissent également favoriser l'immunité à médiation cellulaire (1). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sécrètent des cytokines, favorisant l'activation des lymphocytes B qui se différencient en plasmocytes pour produire des anticorps, ou l'activation de macrophages ou d'autres lymphocytes T dans le but de détruire ce qui est reconnu comme étranger. Les peptides antigéniques présentés par le CMH de classe I sont majoritairement des peptides du soi ou des peptides viraux produits par la machinerie cellulaire, tandis que les molécules du CMH de classe II présentent des peptides exogènes, issus de protéines ou débris internalisés par endocytose ou phagocytose (**figure 1.2**).



**Figure 1.1 Présentation antigénique par une CPA à un lymphocyte T CD4 +**  
 Une fois internalisé, dégradé et apprêté, le peptide antigénique (en rouge) s'associe à une molécule du CMH de classe II. Le complexe peptide / CMH est reconnu par le récepteur des cellules T (RCT), tandis que le co-récepteur CD4 reconnaît la molécule du CMH près de sa région transmembranaire. L'activation du lymphocyte T nécessite un second signal, fourni par l'association entre CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2) et CD28. La signalisation via le récepteur CTLA-4 (non-représenté) fournit un signal inhibiteur au lymphocyte T. Adapté de Janeway et al., 2001 (4)



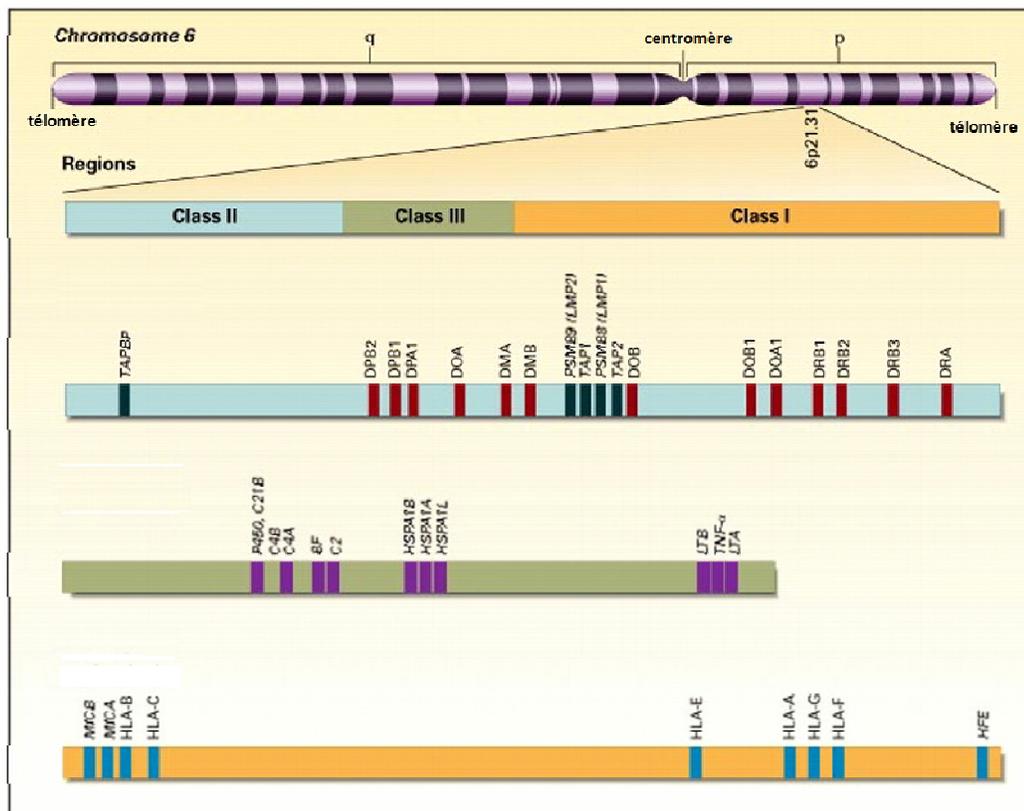
**Figure 1.2 Voies de présentation des antigènes**

(A) *Voie endogène- présentation par le CMH de classe I.* Les protéines endogènes, dénaturées ou simplement de conformation inadéquate (identifiées « défectueuses »), ainsi que les protéines virales obtenues par l'utilisation de la machinerie cellulaire suite à l'infection virale, sont amenées aux protéasomes où elles subissent la dégradation. Les peptides obtenus sont transportés au RE où ils lient la niche peptidique de molécules de classe I. Le complexe formé s'exportera via le Golgi à la surface cellulaire où il pourra être présenté aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. (B) *Voie exogène – présentation par le CMH de classe II.* La cellule capte par endocytose ou phagocytose des protéines extracellulaires, qui seront dégradées dans la voie endolysosomale (MIICs). Les molécules du CMH de classe II, synthétisées dans le RE, traversent l'appareil de Golgi et gagnent la voie endolysosomale. DM catalysera l'échange du fragment CLIP occupant la niche peptidique des molécules du CMH de classe II contre un peptide antigénique. Le complexe CMH-II / peptide sera transporté à la surface cellulaire où il sera présenté aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Adapté de Klein et Sato, 2000 (5).

### 1.1.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité et son locus

Le CMH fut découvert par des expériences de rejets de greffes, où il fut constaté que les rejets étaient moins fréquents chez les individus génétiquement apparentés. Le terme CMH est général : chez l'humain, on le nomme « human leukocyte antigen » (antigène des leucocytes humains; HLA), tandis que chez la souris, on le nomme H-2 (histocompatibility-2).

La région codant pour le CMH constitue une des régions du génome humain les plus denses en gènes (6). Le locus du CMH se trouve sur le bras court du chromosome 6 et porte l'appellation de HLA (human leukocyte antigen). La région HLA compte plus de 200 gènes, dont plusieurs ne sont pas impliqués dans l'immunité (**figure 1.3**). Les gènes de classe III occupent une région séparant les gènes de classe II des gènes de classe I. La région des gènes de classe I est située plus près du télomère. Les gènes de classe III codent pour des protéines non reliées à celles codées par les gènes de classe I et II (5). Les molécules du CMH de classe I et II sont les protéines humaines les plus polymorphiques (6). Les gènes de classe I codent pour la chaîne  $\alpha$  des molécules du CMH-I, tandis que le gène de la  $\beta$ 2-microglobuline se trouve sur le chromosome 15. Les gènes du CMH de classe II codent pour les molécules classiques (HLA-DR, -DQ ET -DP) et non-classiques (HLA-DM, -DO). En général, les gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  d'une glycoprotéine sont adjacents; toutefois, plusieurs gènes séparent les gènes DOA et DOB, codant pour HLA-DO $\alpha$  et HLA-DO $\beta$ . Le nom des loci des différents gènes compte 3 lettres (5). La première lettre désigne la classe, la seconde la famille et la troisième, la chaîne. Ainsi, DRA code pour la chaîne alpha de la famille R, de la classe D. Chez la souris, on retrouve les molécules classiques IA et IE codées par les gènes H2-A et H2-E, ainsi que les non-classiques H2-M et H2-O.



**Figure 1.3 Locus du complexe majeur d'histocompatibilité chez l'humain**

Le locus du CMH, situé sur le bras court du chromosome 6, contient plus de 200 gènes; ce schéma en représente une partie. Les régions codant pour les gènes de classe II, classe III et classe I se succèdent dans un ordre centromérique à télomérique. Fait notable, les gènes DOA et DOB, codant pour HLA-DO $\alpha$  et HLA-DO $\beta$ , sont séparés par plusieurs gènes. Adapté de Klein et Sato, 2000 (5).

## 1.2 Les molécules classiques du CMH de classe II

Les molécules classiques du CMH de classe II sont des glycoprotéines transmembranaires de type I présentant aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> des peptides antigéniques issus de protéines internalisées par endocytose ou phagocytose. Elles sont exprimées par les CPA et peuvent être induites dans d'autres cellules par l'IFN- $\gamma$  (7).

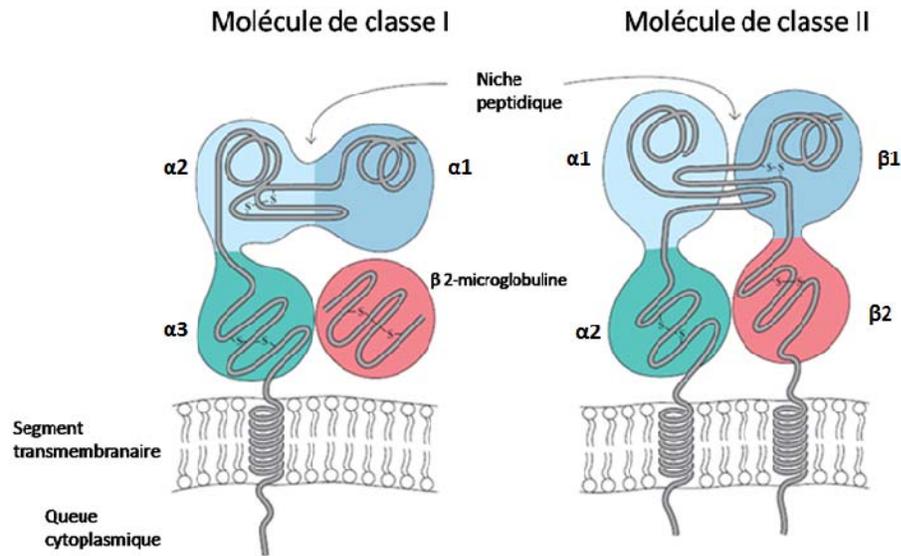
### 1.2.1 Régulation de l'expression

L'étude du « Bare lymphocyte Syndrome », où les patients n'expriment pas de CMH-II, a mis en cause le class II transactivator (CIITA) et le facteur de transcription RFX5 (8;9). CIITA contrôle l'expression transcriptionnelle des molécules classiques du CMH-II (8). Il influence l'expression autant constitutive (8) qu'induite (7); l'induction des molécules du CMH-II par l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) agit via l'induction de CIITA. CIITA ne lie pas directement l'ADN; il agirait en formant un complexe avec des facteurs de transcription tels que CREB, RFX5, NF-YB et NF-YC, qui interagissent avec le promoteur du CMH de classe II (10). Les complexes formés pourraient servir à concentrer les facteurs de transcription au niveau du promoteur.

### 1.2.2 Structure des molécules classiques du CMH de classe II

Une des particularités des molécules classiques du CMH-II est leur très grand polymorphisme (6). Trois isotypes sont représentés chez l'humain, HLA-DR, -DQ et -DP, et deux chez la souris, IA et IE. Ce sont des hétérodimères liés de manière non-covalente, constitués d'une chaîne  $\alpha$  de 31 à 34 kDa et d'une chaîne  $\beta$  de 26 à 29 kDa. Fait notable, des DR1 ont été retrouvés en dimères d'hétérodimères (11;12).

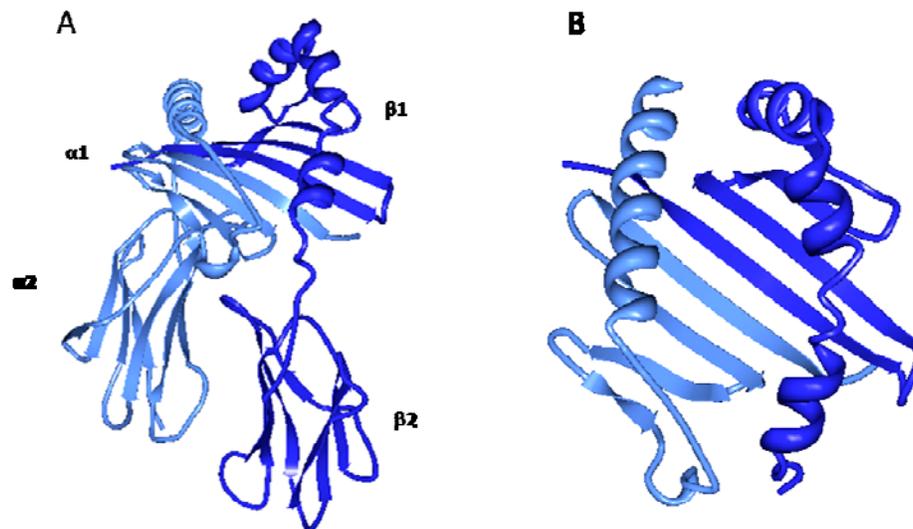
Chaque chaîne possède une courte queue cytoplasmique de 8 à 15 résidus, un domaine transmembranaire hydrophobe de 25 résidus et deux domaines extracellulaires (13). Les domaines distaux à la membrane,  $\alpha$ 1 et  $\beta$ 1, forment la niche peptidique, tandis que les domaines proximaux à la membrane,  $\alpha$ 2 et  $\beta$ 2, possèdent un pont disulfure conservé et une structure typique de la superfamille des immunoglobulines (**figures 1.4 et 1.5A**). Le domaine  $\beta$ 2 est responsable de la liaison à CD4 (14). Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  possèdent respectivement deux et un sites de glycosylation conservés.



**Figure 1.4 Structure des molécules du CMH**

Structure d'une molécule du CMH de classe I (gauche) et de classe II (droite).  
Adapté de Immunology, Kuby et al., 2003 (15)

L'étude de la structure tridimensionnelle des molécules du CMH-II nécessite, chez les molécules classiques, la présence d'un peptide dans la niche peptidique, car les hétérodimères non liés à un peptide ou à Ii sont instables (16). Plusieurs cristaux de molécules de CMH de classe II ont été obtenus par cristallographie à rayons X, chez l'homme et la souris (12;17-21). De ceux-ci, plusieurs éléments constants sont ressortis (13;22). Les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  forment la niche peptidique, caractérisée par un plancher constitué de feuillettes  $\beta$  anti-parallèles qui est bordé d'hélices  $\alpha$  (**figure 1.5B**). Les feuillettes  $\beta$  constituent les parties N-terminales des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Au centre de la niche peptidique, des ponts hydrogènes lient le premier segment du feuillet de la chaîne  $\beta$  au premier segment du feuillet de la chaîne  $\alpha$  (21).

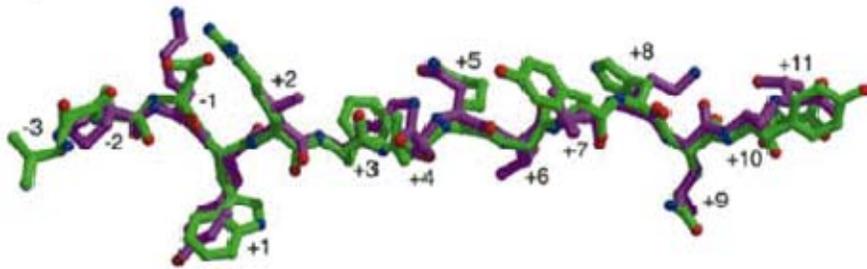


**Figure 1.5 Structure tridimensionnelle d'une molécule classique du CMH-II**  
 (A) Représentation de la région luminale de HLA-DR1; les domaines sont représentés. Les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  forment la niche peptidique (B) Vue supérieure de la niche peptidique. La structure tridimensionnelle fut obtenue par Protein Data Bank (code 1AQD), adaptée de (23).

### 1.2.3 Liaison des peptides

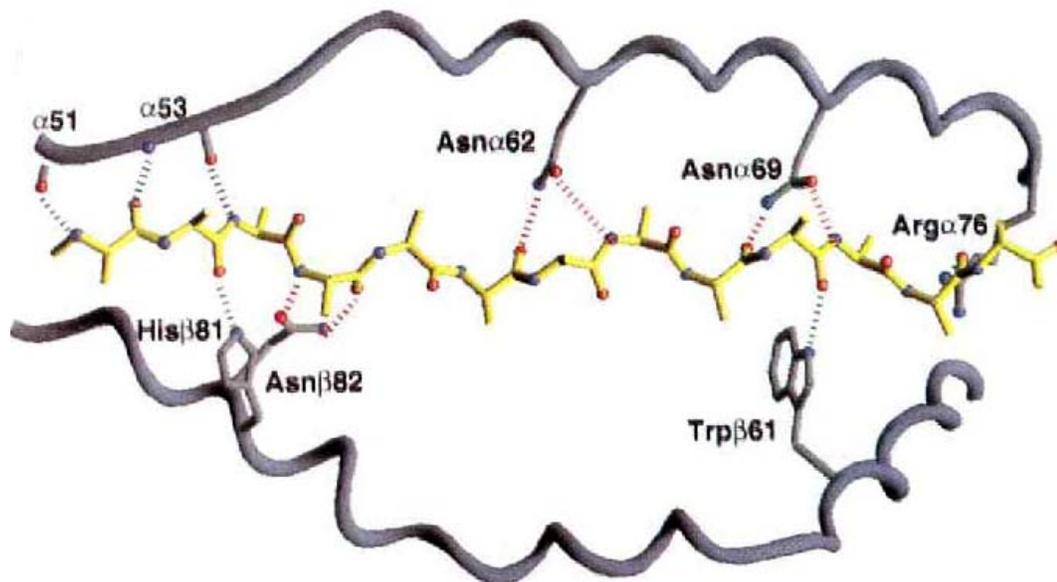
La niche peptidique est ouverte à ses deux extrémités, contrairement à celle des molécules du CMH-I (11;24). Ainsi, contrairement à celle du CMH-I, qui lie des peptides de 7-9 acides aminés, la niche peptidique des molécules du CMH-II permet la liaison de longs peptides qui peuvent dépasser à chaque extrémité. Une étude utilisant I-A<sup>b</sup> et I-E<sup>b</sup> a rapporté la liaison de peptides de 13-17 acides aminés à la niche peptidique (25). Une étude de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) à phase renversée, sur des peptides liés à DR1 récupérés par élution acide, a rapporté la liaison de peptides de 13 à 25 acides aminés (26). Dans cette étude, la longueur de peptide la plus fréquemment retrouvée correspondait à 15 acides aminés. Toutefois, des protéines dénaturées peuvent lier la niche peptidique (27); une protéine intacte de 35 kDa, IP30, a même pu lier certains allèles de HLA-DR (28). Le peptide assume en général une conformation

polyproline de type II (21). Les peptides présentés adoptent une conformation plutôt conservée (**figure 1.6**). Le peptide lie les chaînes latérales de plusieurs acides aminés de la niche peptidique (**figure 1.7**). La stabilité de la liaison du peptide dans la niche peptidique dépend beaucoup des liens hydrogène établis. Récemment, il a été démontré que le résidu H81 de la chaîne DR1 $\beta$  est important dans la liaison des peptides; la mutation H81N entraîne, en absence de DM, une dissociation CMH / peptide semblable à celle observée avec DR1 non mutée en présence de DM (29). Aussi, certains acides aminés semblent conservés dans les peptides liant un allotype donné; ils sont considérés comme des points d'ancrage et sont impliqués dans l'affinité de la liaison CMH-II / peptide (30).



**Figure 1.6 Les peptides liant la niche peptidique ont une conformation similaire**

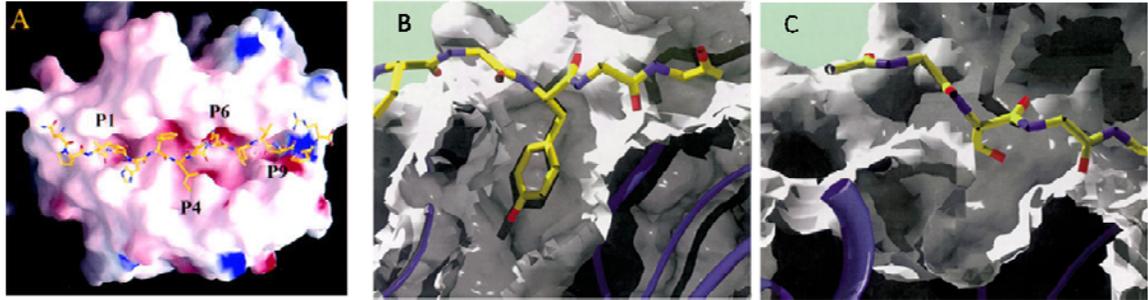
Vue latérale du peptide endogène A2 (vert) et de HA (hémagglutinine; mauve). Les domaines de liaison aux peptides de DR1 ont été alignés, puis l'image de DR1 fut enlevée. Les positions des acides aminés sont indiquées; l'acide aminé en position +1 correspond à la pochette P1 de DR1, et ainsi de suite. Tiré de Murthy et Stern, 1997 (31).



**Figure 1.7 Liaisons hydrogènes entre le peptide et des résidus de la niche peptidique**

Représentation de la niche peptidique de HLA-DR1 liant le peptide HA du virus de l'influenza. Les liaisons hydrogènes sont représentées par des pointillés  
Tirée de Stern et al., 1994 (21)

La niche peptidique forme des pochettes polymorphes pouvant accommoder certains acides aminés et dont l'importance est capitale dans la sélectivité aux différents peptides (21) (**figure 1.8**). Par exemple, DR4 diffère de DR2 au niveau de 10 résidus du feuillet  $\beta 1$ , ce qui se traduit par des différences de spécificité pour les pochettes P1, P4, P6, P7 et P9 (32). D'ailleurs, la pochette P4, qui est particulièrement polymorphe, jouerait un rôle clé dans la susceptibilité à différentes maladies auto-immunes. DR2 possède une pochette P4 large et hydrophobe qui accommode une phenylalanine de la MBP (*myelin basic protein*) humaine (32). DR2 pourrait ainsi favoriser l'expansion clonale de lymphocytes T reconnaissant la MBP humaine associée à DR2. De plus, il semble que la liaison d'un peptide dans la pochette P1 favorise la stabilité au SDS (33) et contribuerait donc à la stabilité de la liaison CMH/peptide.



**Figure 1.8 Accommodation d'acides aminés par les pochettes de la niche peptidique**

(A) Vue supérieure de la représentation de HLA-DR2 complexée au peptide MBP. Certains acides aminés (P1, P4, P6, P9, et P7 (non représenté)) correspondent à une position où se trouve une pochette. Tiré de Smith et al., 1998 (32)

(B) Tyrosine du peptide HA accommodée par la pochette P1 de DR1

(C) Sérine du peptide Ova occupant partiellement la pochette P1 de I-A<sup>d</sup>.

(B et C sont adaptés de McFarland et Beesson, 2002 (34))

## 1.2.4 Présentation antigénique par le CMH-II

### 1.2.4.1 Synthèse et transport des molécules du CMH de classe II

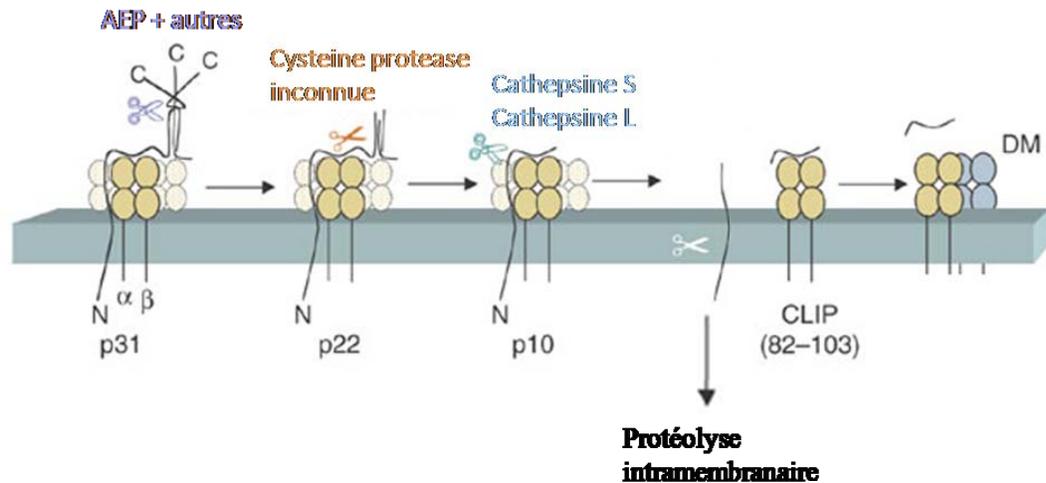
Dans le RE, la chaîne invariante (Ii) s'associe avec la niche peptidique (35) et empêche la liaison d'un peptide (36). Ii aide également les molécules classiques du CMH-II à adopter un bon repliement afin de leur permettre de quitter le RE; en absence de Ii, le dimère  $\alpha\beta$  des molécules du CMH-II serait traité comme une protéine mal conformée, formant des agrégats et étant retenu dans le RE (37). Ii empêche une liaison prématurée dans le RE des peptides endogènes au CMH-II (38;39). Il existe 4 isoformes de Ii, en raison de la présence de deux sites différents d'initiation de la traduction, et d'épissage alternatif. L'isoforme p33, long de 216 acides aminés, est plus courant que p35, p41 et p43 (40). Comme les molécules du CMH-II, l'expression de Ii est augmentée par CIITA et par l'IFN- $\gamma$  (41). Curieusement, Ii est nécessaire pour la maturation des lymphocytes B, en activant une voie de transcription utilisant NF- $\kappa$ B (42).

Dans le RE, un trimère de la chaîne invariante s'associe à trois dimères  $\alpha\beta$  de molécule du CMH de classe II, formant un nonamère (43). Après sa sortie du RE, Ii guide le nonamère vers la voie endosomale (44). Deux motifs dans la queue cytoplasmique de Ii dirigent le complexe vers les endosomes (44-46). Par contre, une partie des complexes CMH/Ii passe directement du Golgi à la surface cellulaire avant d'être relocalisée à la voie endosomale (47); les études ont produit des résultats discordants sur l'importance relative des deux voies empruntées (48-50).

Une fois dans la voie endo-lysosomale, Ii sera dégradée par diverses protéases pour ne laisser que le fragment CLIP, « class II-associated invariant chain peptide » (35;51) (**figure 1.9**). La cathepsine S est essentielle à ce processus (52). La région CLIP de Ii s'étend des acides aminés 81 à 104, et le complexe CMH-II/CLIP est instable au SDS, ce qui témoigne d'une faible association (35). HLA-DM se charge de retirer CLIP et aide à charger un peptide (53;54). Par ailleurs, l'utilisation en laboratoire d'un pH de 5 à une température de 37°C, simulant les conditions retrouvées dans la voie endo-lysosomale, peut induire la dissociation CMH-II / Ii. Dans un tel cas, il a été observé que les molécules du CMH-II ont tendance à s'agréger si elles ne sont pas liées à un peptide, ce qui préviendrait la présence de molécules de CMH-II vides à la surface cellulaire (55).

Les compartiments contenant les complexes CMH-II/peptide peuvent être transportés via les microtubules vers la surface cellulaire à l'aide de la kinésine et revenir dans la région péri-nucléaire à l'aide de la dyénine (56). Des vésicules contenant le MHC-II fusionnent avec la membrane cellulaire (57). Alternativement, la fusion de la membrane des compartiments contenant le CMH-II avec la membrane plasmique peut relâcher les vésicules internes de ces compartiments sous forme d'exosomes (58). De plus, il semble que suite à la maturation des cellules dendritiques, les compartiments contenant le CMH-II peuvent réorganiser leur structure de manière à former des tubules orientés vers la

surface cellulaire (59) qui semblent nécessiter des microtubules (60). Le mécanisme de fusion à la membrane cellulaire n'est pas déterminé.



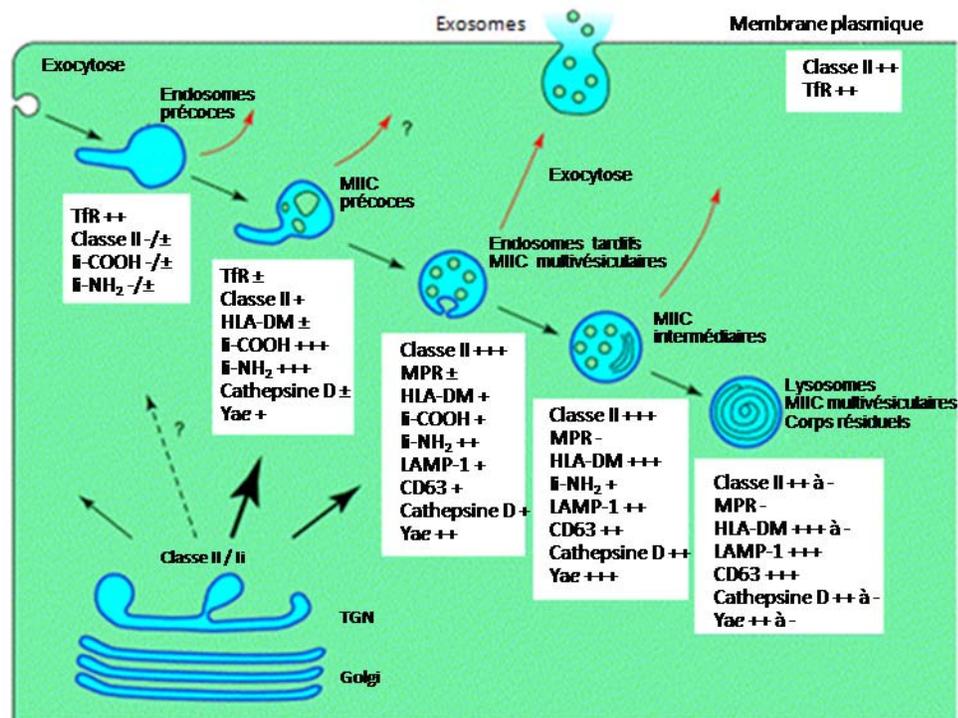
**Figure 1.9 Dégradation de la chaîne invariante**

Dans les endosomes, l'asparaginyl endopeptidase (AEP) ou d'autres protéases clivent la chaîne invariante en C-terminal, en plus d'une étape, laissant un fragment de 10 kDa, p10. Les cathepsines L ou S poursuivent la dégradation, pour ne laisser que le fragment CLIP lié à la niche peptidique. HLA-DM pourra catalyser l'échange de CLIP contre un peptide. Le fragment transmembranaire de la chaîne invariante sera quant à lui sujet à une dégradation additionnelle. Adapté de Watts, 2004 (61).

#### 1.2.4.2 Apprêtement des antigènes

Les protéines ou peptides peuvent être internalisés dans la CPA par endocytose, suivant la liaison au récepteur des cellules B, ou par phagocytose non spécifique ou macropinocytose. Ils se retrouvent ensuite dans la voie endosomale, où leurs ponts disulfures sont réduits par la gamma-interferon-inducible thiols réductase (GILT) (62;63). Ensuite, les protéines sont dénaturées, puis dégradées par des protéases, conduisant à l'obtention de peptides antigéniques (64;65). L'apprêtement des peptides antigéniques semble plus efficace à un pH d'environ 4,5, qu'on peut retrouver dans les lysosomes (66). La voie d'apprêtement des antigènes est caractérisée par la présence de différents compartiments (**figure**

1.10). Par dénomination classique, on retrouve les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes. Chacun possède un pH plus faible et une concentration plus forte en protéases que le précédent (64).



**Figure 1.10 Voie de transport endosomale des molécules du CMH de classe II**  
 Les molécules du CMH de classe II nouvellement synthétisées transitent par l'appareil de Golgi vers la voie endosomale, la plupart du temps via les MIIC précoces ou les endosomes tardifs. Elles sont ensuite transportées dans les compartiments en aval dans la voie endosomale, jusqu'aux lysosomes. Certains complexes CMH-II / Ii sont transportés du Golgi à la surface, puis sont internalisés par endocytose et gagnent les endosomes précoces. Les complexes CMH-II / peptide peuvent quitter la voie endosomale de différentes manières, à partir de plusieurs compartiments (flèches rouges); certains quittent par exocytose dans des exosomes. Les marqueurs moléculaires sont identifiés selon leur abondance, de – à +++. LAMP-1 : *lysosome-associated membrane protein*, MIIC : compartiments à CMH-II, MPR: récepteur du mannose-6-phosphate, TfR : récepteur de la transferrine, TGN: réseau trans-Golgi. Adapté de Geuze, 1998 (67).

### 1.2.4.3 Compartiments de la voie exogène de présentation

La nature exacte des compartiments de la voie endo-lysosomale impliqués dans la présentation antigénique reste à définir. On retrouve des compartiments riches en

molécules du CMH de classe II (**figure 1.10**); l'utilisation de l'appellation MIIC (compartiments à CMH de classe II) est parfois utilisée (68-71). Toutefois, ce terme reste très général et il pourrait dans certains cas se confondre avec les endosomes ou lysosomes traditionnels (72;73). Les MIIC rappellent les lysosomes (70). Ils ont la particularité de porter les *lysosome-associated membrane proteins* (LAMP) à leur surface (69). La densité de leur membrane diffère de celle des autres endosomes ou lysosomes (68). Ces compartiments contiennent des antigènes et les immunoglobulines internalisées (68;71) et pourraient ne pas contenir d'antigènes internalisés par endocytose de phase fluide (71). Dans ces compartiments, li est dégradée et les peptides sont chargés (69).

### **1.3 Les molécules non-classiques du CMH de classe II**

#### **1.3.1 HLA-DM**

HLA-DM est une molécule considérée comme non-classique du CMH de classe II puisqu'elle se démarque par son faible polymorphisme (74). Par ailleurs, elle ne peut lier les peptides (75) et on ne la retrouve pas en surface, contrairement aux molécules classiques (76). La séquence de DM ne présente qu'une homologie d'environ 30% avec les molécules classiques du CMH de classe II (77). HLA-DM est une glycoprotéine de type I, comme les molécules classiques. C'est un hétérodimère codé par DMA et DMB, constitué d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  de respectivement 33-35 kDa et 30-31 kDa une fois matures (78). Curieusement, chez la souris, H2-M possède deux gènes, Mb1 et Mb2, codant pour des chaînes  $\beta$  fort similaires, dont les divergences de séquence se situent majoritairement dans le domaine  $\beta$ 1 (79).

##### **1.3.1.1 Expression cellulaire**

Le profil d'expression de DM est le même que celui des molécules classiques du CMH-II : DM est donc retrouvée dans toutes les cellules présentatrices d'antigènes. Cependant, son niveau de transcription est plus faible

(79). L'expression de DM dépend de CIITA, comme dans le cas des molécules classiques, et est inductible par l'IFN- $\gamma$  (41). Par ailleurs, une bonne partie de DM est trouvée complexée à HLA-DO, mais on retrouve également du DM libre dans les cellules B (80;81).

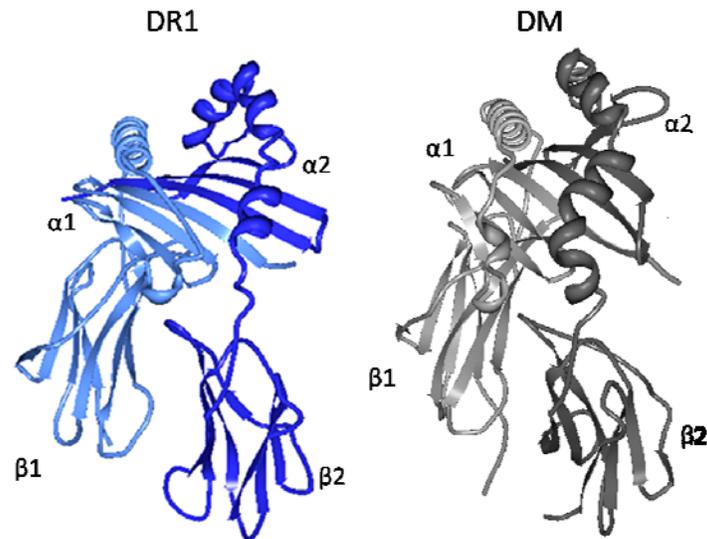
### 1.3.1.2 Ciblage intracellulaire

L'hétérodimère  $\alpha\beta$  est assemblé dans le RE. Contrairement aux autres molécules du CMH de classe II, DM ne dépend pas de sa liaison à un peptide ou une autre molécule pour adopter une conformation stable et quitter le RE. HLA-DM se retrouve dans les compartiments endolysosomaux ou MIICS; il ne réside pas en surface (76). En effet, un motif tyrosine dans la queue cytoplasmique de DM $\beta$  ou H2-M $\beta$  mène la molécule aux lysosomes (MIICs) (82;83). Toutefois, chez les cellules dendritiques (DC) immatures, DM ou H2-M peuvent être exprimés à la surface (84-86). Puisque les DC immatures dérivées de cellules de moelle osseuse ou de la rate expriment en surface du CMH-II vide (87), les DC immatures semblent posséder une voie externe d'apprêtement des antigènes (86). DM est en mesure de favoriser l'association d'un peptide à la niche peptidique au niveau de la surface cellulaire et possiblement dans les endosomes de recyclage (85). Cette voie pourrait élargir le répertoire de peptides présentés (86), et permettre de présenter entre autres des peptides qui sont normalement dégradés dans les lysosomes (85); elle pourrait être importante dans le mécanisme de tolérance (86). DM a aussi été trouvé en surface chez les cellules de Langerhans (88) et chez les cellules B (85).

### 1.3.1.3 Structure de DM

En 1998, l'équipe de D.C. Wiley a obtenu le cristal de HLA-DM (89) et celle de D.Fremont, le cristal de H2-M (90). La structure de DM est semblable à celles des molécules classiques du CMH de classe II (**figure 1.11**). Par contre,

DM se démarque par la conformation fermée de sa niche peptidique, ce qui explique son incapacité à lier des peptides.



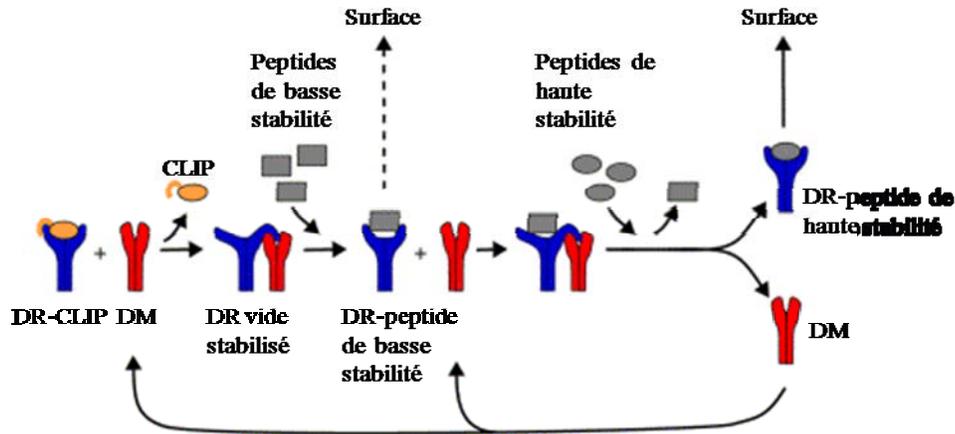
**Figure 1.11 La structure de DM est semblable à celles des molécules classiques du CMH de classe II**

Représentation des régions lumineuses des structures tridimensionnelles de DR1 et DM. Les différents domaines sont indiqués. Les images ont été obtenues par Protein Workshop (code 1A9D pour DR1 (structure adaptée de (31)) et code 2bc4 pour DM (structure adaptée de (91))).

#### 1.3.1.4 Fonction de DM

Puisque DM ne lie pas les peptides, son rôle diffère de celui de DR, DP ou DQ. Il a été démontré que DM servait à catalyser, au niveau de la niche peptidique d'une molécule du CMH-II, l'échange de CLIP contre un fragment peptidique de plus haute affinité (**figure 1.12**) (54;92). En absence de DM, CLIP est rarement enlevé de la niche peptidique et peu de peptides peuvent être présentés par la CPA. Ainsi, en absence de DM, les complexes CMH-II / CLIP sont plus nombreux à la surface cellulaire qu'en présence de DM; c'est aussi le cas avec H2-M, chez la souris (93). Par ailleurs, DM déloge de la niche peptidique les peptides de faible affinité, favorisant les peptides de haute affinité (**figure 1.12**)

(92). Ainsi, DM contribue à modifier le répertoire de peptides présentés par les CPA.



**Figure 1.12 Fonction de DM**

Le complexe DR-CLIP n'est pas caractérisé par une forte stabilité. DM catalyse la dissociation du fragment CLIP de la niche peptidique d'une molécule du CMH de classe II (représentée par DR). DM demeure liée à DR jusqu'à ce qu'un nouveau peptide se lie à la niche peptidique. À ce moment, DM n'est plus liée à DR. Si le peptide possède une basse affinité envers la niche peptidique, le complexe DR-peptide sera instable. Il pourrait se retrouver en surface, mais il est plus probable que DM agisse à nouveau et catalyse son échange pour un autre peptide. Plusieurs cycles d'échange peuvent survenir (non représentés pour simplifier la figure). Enfin, un peptide de haute affinité prend place dans la niche peptidique; il ne sera pas délogé et pourra être exprimé en surface. En contribuant à sélectionner des peptides de haute affinité, DM module le répertoire de peptides pouvant être exprimés à la surface de la cellule. Traduit de Brocke et al., 1992 (94).

Récemment, une étude a suggéré que DM puisse comparer l'affinité du peptide à enlever de la niche peptidique à celle du peptide candidat qui pourrait prendre sa place (95). En effet, l'étude, utilisant la résonance paramagnétique électronique et la polarisation de fluorescence, a entre autres permis de proposer que l'affinité et la concentration de peptides dans le milieu influenceraient la dissociation catalysée par DM du complexe peptide/niche peptidique.

Un rôle important de DM dans l'échange peptidique consiste à stabiliser DR en absence de peptide (**figure 1.12**). Il a été démontré que DM demeurait lié à

DR après la dissociation de CLIP, et aussi que le dimère DR  $\alpha\beta$  non-lié à un peptide demeurerait plus longtemps en mesure de lier un peptide si DM est présent (96). Ainsi, DM stabiliserait DR et empêcherait l'aggrégation des dimères vides, préservant leur capacité à lier les peptides. C'est à pH acide, aux environs de pH 5, tel que retrouvé dans les compartiments endosomaux tardifs, que DM lie DR et enlève CLIP de la niche peptidique (53;54). À ce moment, DM stabilise DR, puis un peptide peut se loger dans la niche peptidique.

### 1.3.1.5 Association avec DR

Il a été montré que DM lie DR $\alpha$ . À tout le moins, dans diverses études établissant des mutations diminuant la liaison DR-DM, il a été démontré que l'interface de liaison impliquait DR $\alpha$  et DM $\beta$ , alors que DR $\beta$  et DM $\alpha$  semblent impliquées dans une moindre mesure (97). Récemment, il a été suggéré qu'il fonctionne en mécanisme « hit and run » dans lequel DM se lierait transitoirement à DR. Dans ce modèle, DM ne resterait pas lié à DR (29). La brève liaison aurait induit un état réceptif à la liaison de peptide, mais DR perdrait rapidement sa capacité de lier un peptide; la conformation de DR serait restaurée s'il rencontrait à nouveau DM. DR lierait un peptide seulement s'il le rencontrait rapidement après avoir rencontré DM. Ce mécanisme rendrait toutefois difficiles les co-précipitations DM-DR et demeure spéculatif.

### 1.3.2 HLA-DO

Comme HLA-DM, HLA-DO est une molécule cataloguée comme non-classique du CMH-II, car elle est non polymorphe. De plus, comme DM, elle est incapable de lier des peptides et n'est pas retrouvée à la surface cellulaire. DO est un hétérodimère dont la chaîne  $\alpha$  atteint 25 kDa et la chaîne  $\beta$ , 28 kDa. Après addition d'oligosaccharides, la chaîne  $\alpha$  atteint 32-34 kDa et la chaîne  $\beta$ , 33-34 kDa (98).

DO $\beta$  a été décrite en 1985. Sa séquence en acides aminés diverge davantage des molécules classiques du CMH de classe II que ces dernières

différent entre elles (99). La séquence d'acides aminés de DO $\beta$  présente environ 50% d'identité avec celle de DR $\beta$  (99;100). Entre autres, les domaines  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 de DO possèdent 59% de similarité avec ceux de DR (101). Cette similarité de séquence semble se refléter dans sa structure, car une expérience a montré qu'une chimère constituée de DO $\beta$  et dont les dix-huit premiers acides aminés étaient remplacés par ceux de DR $\beta$  pouvait lier DO $\alpha$  (101). Par ailleurs, une étude a montré que les substitutions entre DO $\beta$  et DR1 $\beta$  sont présentes majoritairement à des endroits exposés au solvant ou dans les pochettes de la niche peptidique; les résidus conservés permettraient en théorie un repliement de DO $\beta$  semblable à celui de DR1 $\beta$  (101). DO $\beta$  est non polymorphe et possède des cystéines conservées, ainsi qu'une asparagine qui constitue un site de glycosylation potentiel (99); par contre, sa queue cytoplasmique est plus longue que celle des molécules dites classiques du CMH-II. DO possède une région N-terminale particulièrement hydrophobe non caractéristique des autres molécules du CMH de classe II (100).

Le gène DOA fut aussi décrit en 1985. Il fut initialement nommé DZA (102) ou DNA (103). Son faible polymorphisme est remarqué (104). La séquence de DOA est autant semblable aux séquences des chaînes alpha des molécules classiques du CMH de classe II que ces dernières le sont entre elles (102). La séquence d'acides aminés de DO $\alpha$  présente environ 60% d'identité avec celle de DR $\alpha$  (102;105). Globalement, la séquence d'acides aminés de DO est semblable à celles des molécules classiques (**figure 1.13**).

Par ailleurs, les séquences des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de DO sont davantage similaires à leurs homologues respectifs de DQ qu'à ceux de DR, particulièrement en N-terminal (**figure 1.13**). Cette similitude pourrait se répercuter dans la structure, bien que cette dernière soit difficile à prévoir. DO montre de plus fortes similarités que DM avec les molécules classiques, puisque les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de cette dernière présentent à peine un peu plus de 30% de similarité avec leurs équivalents chez les molécules classiques du CMH de classe II (103;106).

**A**

DR $\alpha$	IKEEHV-I IQAEFYLNPDQSGEFMFDGDEIFHVDMAKKETVWRLEEFGRFASF EAQGA	59
DO $\alpha$	TKADHMGSYGPAFYQSYGASGQF THEFDEEQLEFSVDLKKSEAVWRLPEFGDFARFDPQGG	60
DR $\alpha$	LANIAVDKANLEIMTKRSNYTPI TNVPEVTVL TNSPVLELREPVLICFIDKFTPPVVNV	119
DO $\alpha$	LAGIAAIKAHLDI LVERS NR SRAINVPPRVTVLPKSRVELGQPNILICIVDNI FPPVINI	120
DR $\alpha$	TWLRNGKPVTTGVSETVFLPREDHLFRKFHYLPFLPSTEDVYDCRVEHWGLDEPLLKHWE	179
DO $\alpha$	TWLRNGQTVTEGVAQTSFY SQPDHLFRKFHYLPFVPSAEDVYDCQVEHWGLDAPLLRHWE	180
DR $\alpha$	FDAPSPLPETTENVVCALGLTVGLVGI IIGTIFI I KGLRKSNA AERRGPL	229
DO $\alpha$	LQVPIPPDAMETLVCALGLAIGLVGFLVGTVLI IIMGTVYSSVPR-----	225
DR $\beta$ 1	GDTRPRFLWQLKFECHFFNGTERVRLLERCIYNQEE SVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEY	60
DO $\beta$	TDSPEDFVIQAKADCYFTNGTEKVQFVVRFI FNLEEYVRFDSDVGMFVALTKLGQPD AEQ	60
DR $\beta$ 1	WNSQKDLLEQRRAAVD TYCRHNYGVGESFTVQRREPKVTVYPSKTQPLQHNNLLVCSVS	120
DO $\beta$	WNSRLDLLERSRQAVDGVCRHNYRLGAPFTVGRKVQPEVTVYPERTPLLHQHNNLLHCSVT	120
DR $\beta$ 1	GFYPGSIEVRWFRNGQEEKAGVVSTGLIQNGDWTFTQTLVMLETVPRSGEYVTCQVEHPSV	180
DO $\beta$	GFYPGDIKIKWFLNGQEERAGVMSTGPIRNGDWTFTQTVVMLEMTPELGHVYTCLVDHSSL	180
DR $\beta$ 1	TSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLLFLGAGLFIYFRNQKHSGLQPTG-----	234
DO $\beta$	LSPVSVIEWRAQSEYSWRKMLSGIAAFLGLIFLLVGIQLRAQKGYVRTQMSGNEVSRA	240
DR $\beta$ 1	-FLS---	237
DO $\beta$	VLLPQSC	247

**B**

DQ $\alpha$ 2	IVADHVASYG VNFYQSHGPSGQY THEFDGDEEFYVDLETKETVWQLPMSKFI SFDPQSA	60
DO $\alpha$	TKADHMGSYGPAFYQSYGASGQF THEFDEEQLEFSVDLKKSEAVWRLPEFGDFARFDPQGG	60
DQ $\alpha$ 2	LRNMAVGKHTLEFMMRQSNSTAATNEVPEVTVFSKFPVTLGQPNILICIVDNI FPPVVNI	120
DO $\alpha$	LAGIAAIKAHLDI LVERS NR SRAINVPPRVTVLPKSRVELGQPNILICIVDNI FPPVINI	120
DQ $\alpha$ 2	TWLSNGHSVTEGVSETSFLSKSDHSFFKISYLTFLPSADEIYDCKVEHWGLDEPLLKHWE	180
DO $\alpha$	TWLRNGQTVTEGVAQTSFY SQPDHLFRKFHYLPFVPSAEDVYDCQVEHWGLDAPLLRHWE	180
DQ $\alpha$ 2	PEIPAPMSEL TETLVCALGLSVGLMGIVVGTVFI IQGLRSVGASRHQGLL	230
DO $\alpha$	LQVPIPPDAMETLVCALGLAIGLVGFLVGTVLI IIMGTVYSSVPR-----	225
DQ $\beta$	RDSPEDFVYQFKGMCYFTNGTERVRLVSRSIYNREEIVRFDSDVGEFRAVTL LGLPAAEY	60
DO $\beta$	TDSPEDFVIQAKADCYFTNGTEKVQFVVRFI FNLEEYVRFDSDVGMFVALTKLGQPD AEQ	60
DQ $\beta$	WNSQKDI LERKRAAVDRVCRHNYQLELRTTLQRRVEPTVTISPSRTEALNHHNNLLVCSVT	120
DO $\beta$	WNSRLDLLERSRQAVDGVCRHNYRLGAPFTVGRKVQPEVTVYPERTPLLHQHNNLLHCSVT	120
DQ $\beta$	DFYPAQIKVWFRNDQEETAGVVSTPLIRNGDWTFCILVMLEMTPQRGDVYTCHVEHPSL	180
DO $\beta$	GFYPGDIKIKWFLNGQEERAGVMSTGPIRNGDWTFTQTVVMLEMTPELGHVYTCLVDHSSL	180
DQ $\beta$	QSPITVEWRAQSESAQSKMLSGIGGFVLGLLIFLGLLI THHRSQKGLLH-----	229
DO $\beta$	LSPVSVIEWRAQSEYSWRKMLSGIAAFLGLIFLLVGIQLRAQKGYVRTQMSGNEVSRA	240
DQ $\beta$	-----	
DO $\beta$	VLLPQSC	247

**Figure 1.13 DO possède une forte identité de séquence avec les molécules classiques du CMH de classe II**

(A)-Les séquences protéiques de DR et DO sont comparées. La chaîne DR $\beta$ 1 est utilisée. (B)- Les séquences protéiques de DQ et DO sont comparées. La chaîne DQ $\alpha$ 2 est utilisée. L'identité des acides aminés est soulignée en gris.

Bien que, contrairement aux autres gènes du CMH-II, les gènes DOA et DOB soient séparés par plusieurs gènes (**figure 1.3**) et que la régulation de l'expression des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  semble différer, ils forment *in vivo* un hétérodimère fonctionnel (103). La faible stabilité de DO et son expression tissulaire limitée pourraient expliquer le délai de dix ans séparant la découverte des gènes de la découverte de l'hétérodimère fonctionnel.

### 1.3.2.1 Structure de DO

La structure cristalline de DO n'a pas été résolue. La faible expression obtenue chez les cellules d'insecte n'a pas permis d'obtenir des quantités suffisantes de DO pour permettre la formation de son cristal (Daved Fremont, communication personnelle). Pourtant, ce système de cellules d'insecte produit habituellement de grandes quantités de protéines. Il est privilégié pour la production de protéines destinées à la cristallisation de molécules du CMH (107;108) On rapporte une production de 1 mg/L de culture (109). La faible expression de DO serait liée à son instabilité, due à une conformation non optimale. En effet, sa conformation non optimale lui empêche de sortir du RE, malgré l'absence de signal de rétention comme les signaux di-basiques (110;111). DM corrige la conformation de DO et l'aide à sortir du RE (voir section 1.3.2.4).

Puisque la structure tridimensionnelle de DM est semblable à celle des molécules classiques (**figure 1.11**), malgré une forte différence dans la séquence d'acides aminés, il est probable que la forte similarité de la séquence d'acides aminés de DO à celle des molécules classiques (**figure 1.13**) se traduise par une structure similaire. La forte ressemblance des séquences DO et DQ pourrait permettre d'utiliser le modèle tridimensionnel de DQ pour donner une idée générale de la structure de DO.

### 1.3.2.2 Distribution cellulaire

L'expression de DO et H-2O se limite surtout aux cellules B et aux cellules épithéliales thymiques. Certaines sous-populations de cellules dendritiques (DC) l'expriment également (112;113). Dans le thymus, DO est retrouvé dans les cellules épithéliales corticales et médullaires. Certaines de ces cellules n'expriment pourtant pas DR (114).

Chez les cellules B, dans la moelle osseuse, le stade pro-B précède pré-B, puis le stade immature; l'activation des cellules B induit la formation de cellules de transitions retrouvées en périphérie, qui deviennent ensuite matures (cellules folliculaires ou de la zone marginale). Leur activation les différencie en plasmocytes ou cellules B mémoires dans les centres germinaux. Chez les cellules B, les cellules de la moelle osseuse expriment DM et DR à partir du stade pro-B, contrairement à DO, dont l'expression augmente de manière dramatique chez les cellules matures, corrélant avec les niveaux de CLIP de surface (80). H2-O apparaîtrait un peu plus tôt dans les cellules B, au niveau des cellules B de transition dans la rate. Chez les cellules matures, les cellules folliculaires et celles de la zone marginale expriment des niveaux similaires de H2-O (115), tandis que H2-M est exprimé à partir des cellules immatures. Par ailleurs, chez les cellules B des centres germinaux (GC), le niveau de DO baisse dramatiquement et le ratio DM/DO diminue, bien que l'expression de DM soit aussi diminuée (80;116). Chez la souris, H2-O est modulé à la baisse dans le GC, alors que le niveau d'expression de H2-M demeure stable (115). Ainsi, il est probable que la diminution des ratios DO/DM dans les cellules activées augmente leur capacité à présenter des antigènes, ce qui est utile dans la sélection positive qui se déroule dans les GC (77). La différenciation en plasmocytes induira une baisse de l'expression de DO; par contre, les cellules B mémoires expriment DO (77;80).

L'expression de DO chez les DC n'est connue que depuis 2006 (117) et son étude reste à approfondir. En 2006, l'équipe de Jensen vérifia l'expression de H2-O par cytométrie en flux, immunobuvardage de type Western et microscopie

confocale, ainsi que les niveaux d'ARNm de H2-O $\beta$  par Northern Blot (113). H2-O fut retrouvé dans les DC myéloïdes de la rate et des ganglions lymphatiques, mais n'était pas exprimé dans les DC primaires de la moelle osseuse ni les DC plasmacytoïdes périphériques. Ces dernières sont impliquées dans la tolérance immunitaire. Une autre équipe a par contre détecté H2-O dans les DC plasmacytoïdes et les DC dérivées de la moelle osseuse (115); la différence observée pourrait être due à l'anticorps utilisé. Chez l'humain, il fut rapporté que chez les sous-populations CD11c+ spléniques de DC, les DC lymphoïdes expriment davantage DO que les plasmacytoïdes, qui expriment davantage que les myéloïdes (117). Plusieurs types de cellules myéloïdes expriment DO, dont les cellules de Langerhans, les *tonsillar interdigitating dendritic cells* et certaines sous-populations de DC circulantes, mais les DC dérivées de monocytes ne l'expriment pas (117).

### 1.3.2.3 Régulation de l'expression de DO

Il a été démontré que l'expression de DO $\alpha$  (118) et, plus récemment, DO $\beta$ , chez les lymphocytes B (119) et les CPA non professionnelles (120), est influencée par CIITA. Toutefois, DO $\beta$  peut être exprimé en l'absence de CIITA chez les lymphocytes B (119), ce qui le différencie des autres molécules du CMH-II; de plus, l'effet de CIITA sur DO $\beta$  est moindre que sur les autres molécules du CMH-II (120). Cela pourrait expliquer pourquoi on a longtemps cru que DO $\beta$  n'était pas induit par l'IFN- $\gamma$  (99). Le contrôle de l'expression de DO $\beta$  est considéré distinct par rapport aux autres chaînes des molécules du CMH-II. Le promoteur de DO possède les boîtes W, X1 et Y, retrouvées chez les molécules classiques, en plus de la boîte OCT (121). Normalement, CIITA recrute divers facteurs de transcription pour former un complexe qui interagit avec le promoteur. Or, bien que CREB-1, RFX-ANK et Oct-2 occupent le promoteur de DOB *in vivo*, CIITA et Bob-1 n'y sont que faiblement recrutés, ce qui pourrait résulter en une activation de transcription par CIITA moindre que celle des molécules classiques. De plus,

la possibilité de l'existence d'un autre facteur contrôlant l'expression de DO est renforcée par l'obtention de l'expression de DO en fusionnant la lignée Bjab, qui n'exprime pas DO $\beta$ , aux cellules .174, qui ne possèdent pas les gènes DO (121).

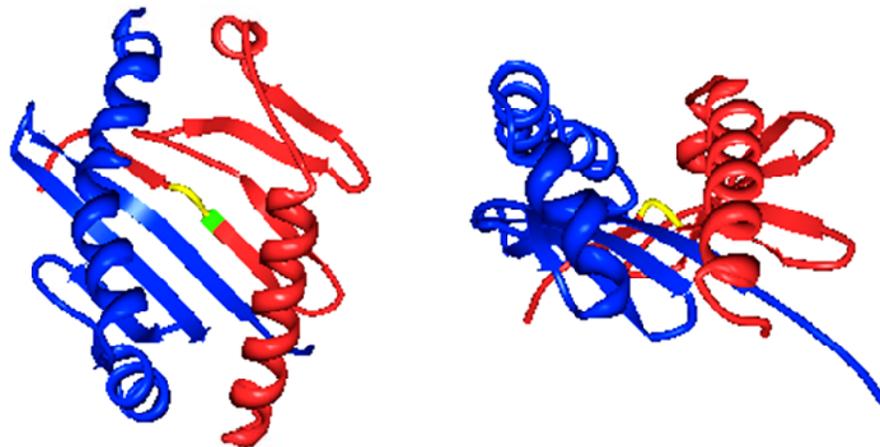
#### 1.3.2.4 Sortie du RE et localisation

DO est retenu dans le RE, bien qu'il ne possède aucun signal de rétention. H2-O peut lier très faiblement Ii, mais la présence de Ii n'entraîne pas la sortie de H2-O ou DO du RE (103). DO est une molécule instable qui ne peut quitter le RE que par son association avec DM (103). Le ciblage vers les lysosomes est sous le contrôle du motif tyrosine de DM, bien que la queue cytoplasmique de DO $\beta$  possède un motif di-leucine de localisation lysosomale et un motif de type tyrosine (122). L'ajout de la queue cytoplasmique de DO $\beta$  à une molécule rapporteuse CD8 $\alpha$  permet une expression lysosomale. Il a été proposé que le motif di-leucine de DO $\beta$  envoie le complexe DODM vers des compartiments moins acides, où l'action de DO sur DM est possible. En remplaçant la queue cytoplasmique de DO $\beta$  par celle de CD8, le groupe de Neefjes a démontré que DM et DR possédaient une distribution diffuse au sein des corps multivésiculaires (ou MIICs); la queue cytoplasmique de DO $\beta$  sert à localiser les complexes DO-DM et DR aux membranes limitantes des MIICs et, dans une certaine mesure, à leurs membranes internes (123). Cette redistribution pourrait, en rapprochant DM de DR, favoriser leur interaction. La même étude montre que les complexes DM-DO sont trouvés à la membrane cellulaire et seraient ré-internalisés, revenant vers les MIICs. Enfin, l'effet chaperon de DM sur DO pourrait avoir une autre implication: H2-O semble dégradé plus rapidement en absence de H2-M (103).

Il a été aussi démontré que DO pouvait lier la chaîne lourde des molécules de classe I et que ce complexe pouvait se retrouver en surface (124). Le phénomène fut observé dans des cellules transfectées, mais également à un faible niveau dans des cellules B primaires. La chaîne lourde des molécules de classe I nécessite normalement l'association à la  $\beta$ 2-microglobuline pour sortir du RE.

L'association DO/chaîne lourde semble quantitativement négligeable et on peut généraliser que DO ne sort pas du RE en absence de DM.

Des expériences utilisant des combinaisons  $\alpha/\beta$  inter isotypiques ou inter alléliques non appariées ont suggéré que le mésappariement en N-terminal pouvait, en raison de la conformation, empêcher la sortie du RE (125). Par ailleurs, la comparaison des séquences des molécules du CMH de classe II montre que DO et DQ présentent un acide aminé supplémentaire, une glycine, entre les positions 9 et 10, non retrouvé chez DR ou DP (cette position peut être identifiée 9b, ou encore 10, si on modifie d'une position la numérotation des acides aminés situés en aval; le cas de DO sera ici traité selon la seconde nomenclature). Cette glycine crée un renflement du plancher de la niche peptidique (**figure 1.14**) Chez DO, cet acide aminé est voisin d'une proline en position 11. Cette proline, peu flexible et liant peu les autres acides aminés, pourrait perturber les feuilletts  $\beta$ . Son remplacement par une valine semble corriger la conformation de DO; le mutant  $DO\alpha P11V$  est capable de sortir du RE en absence de DM (111).



**Figure 1.14 Encombrement stérique causé par la glycine en position 9 de la chaîne  $\alpha$  de DQ2**

La niche peptidique de DQ2 est représentée en vue supérieure à gauche et vue latérale à droite. En rouge : DQ2 $\alpha$ ; en bleu : DQ2 $\beta$ . En jaune est représentée la glycine 9 de la chaîne  $\alpha$ . En vert est représentée la valine de la position 10. (La structure HLA-DQ2 (1s9v) a été faite avec Protein Data Bank, visualisée avec le programme MBT Protein Workshop 3.0)

Enfin, une étude a produit des résultats contradictoires avec ce qui est généralement accepté concernant la localisation de DO (126). Selon cette étude, chez les cellules B, DO co-localiserait surtout avec la transferrine, marqueur d'endosomes précoces et de recyclage, alors que DM colocalise avec LAMP-1, un marqueur caractéristique des endosomes tardifs et lysosomes. DO semble très présent dans le Golgi, puis surtout dans les endosomes précoces. Une centrifugation par densité de gradient Nicodenz, permettant de séparer les différents compartiments, a montré que DO se retrouve dans des vésicules de haute densité représentant la membrane plasmique (à exclure, dans le cas présent), l'appareil de Golgi et le RE, ainsi que des vésicules de faible densité (endosomes précoces et de recyclage), tandis que DM se retrouvait surtout dans des vésicules correspondant aux endosomes tardifs et lysosomes. Selon cette étude, peu de DO aurait accès aux compartiments où sont dirigés les antigènes internalisés par le récepteur des cellules B (BCR), où le complexe BCR-ag co-localise davantage avec DM que DO.

### **1.3.2.5 Liaison DO-DM**

Il a été démontré que la liaison DO-DM est forte. Elle résiste au traitement au Triton X-100 (103), alors que la liaison DM-DR ne résiste pas au NP40 (127). Par contre, chez les cellules B primaires de souris, du H2-O libre fut retrouvé dans des compartiments ultérieurs au Golgi, ce qui témoignerait d'une liaison de moindre stabilité (115). Chez l'humain, les molécules de DO retrouvées hors du RE sont pratiquement toutes liées à DM (80;128). Quant à DM, chez les cellules B, 60 à 70% de DM précipite avec DO (81); une autre étude sur des cellules B sanguines et des cellules Raji a montré que 50% de DM était lié à DO (80). 67% de H2-M serait associé à H2-O dans les cellules B de souris (115). Le DM libre pourrait être issu de complexes DODM dissociés, et son partenaire DO serait dégradé (129). Ceci se conformerait au modèle selon lequel le pH acide dissocie DO de DM.

Les sites impliqués dans la liaison DO-DM ne sont que partiellement connus. DO $\alpha$  est responsable de la liaison avec DM (111). L'acide aminé  $\alpha$ 41E, situé dans le domaine  $\alpha$ 1 de DO, semble impliqué dans la liaison DO-DM. Une mutation  $\alpha$ E41K a réduit la liaison DO-DM, sans toutefois l'abolir complètement. Cette lysine en position 41 est homologue à la lysine DR $\alpha$ 40, qui est impliquée dans la liaison DR-DM. Il serait donc possible que DO et DR lient les mêmes sites sur DM. Toutefois, certains des acides aminés de DR situés à la surface d'interaction DM-DR sont conservés chez DO; pourtant, chez DO, ces acides aminés ne lient pas DM. Aussi, puisque des mutations sur DM affectant sa liaison avec les molécules classiques n'affectent pas la liaison avec DO (130), DO et DR ne lient probablement pas DM au même site. Néanmoins, il reste à établir si DO agit par compétition avec DR pour la liaison à DM ou si DO modifie la conformation de DM, rendant impossible ou inefficace la liaison à DR.

Par ailleurs, des expériences où de longs segments de DO $\alpha$  étaient remplacés par ceux de DR $\alpha$ , à partir du N-terminal, ont démontré entre les positions 80 et 84 de DO $\alpha$  la présence d'un ou plusieurs acides aminés importants pour la liaison à DM (111). L'étude de l'expression de surface de mutants E76K/R80S et R80Y/A83I de la chaîne  $\alpha$  semble indiquer que l'acide aminé DO $\alpha$ R80 est également impliqué dans le lien DO-DM (131). Par contre, il fut démontré dans une autre étude que la mutation de l'arginine  $\alpha$ 80 en cystéine n'affectait pas la fonction de DO, puisque ce DO mutant a empêché la formation de complexes CMH-II/peptide stables au SDS qui témoignent de l'échange peptidique catalysé par DM (132). L'étude des acides aminés de la région  $\alpha$ 80-84 de DO est compliquée par le fait qu'un mutant de DO, où la région  $\alpha$ 80-84 était remplacée par celle de DR, a subi un changement de conformation (111) empêchant l'expression de surface de DOP11V.

### 1.3.2.6 Fonction de DO

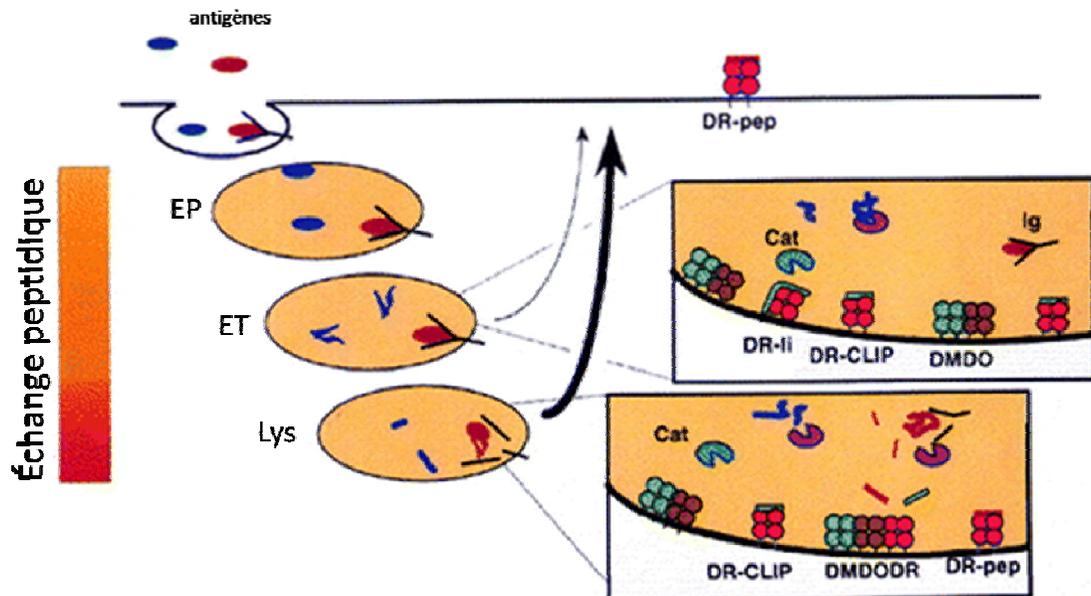
Il n'a jamais été démontré que DO pouvait présenter des fragments peptidiques. Une étude de chromatographie d'exclusion à haute performance a montré que DO, comme DM, ne pouvait lier les divers peptides, incluant CLIP, que DR pouvait présenter (75). Il a été démontré que DO empêche l'action de DM. DO lie DM et le complexe stable DM-DO ne peut pas catalyser l'échange de CLIP pour un autre peptide (133;134). Ainsi, en absence de DO, les cellules présentent de nombreux complexes CMH/CLIP en surface. De plus, DO diminue la quantité totale de complexes CMH/peptide stables (134). Toutefois, une étude a rapporté que DM-DO peut charger un peptide plus ou moins facilement que DM seul, selon l'allèle de DR utilisé (81). L'action de DO est surtout visible à pH peu acide, à environ un pH de 6, tel que retrouvé dans les endosomes ou lysosomes précoces. À mesure que les complexes progressent le long de la voie endolysosomale, l'inhibition exercée par DO sur DM est levée. À pH acide, DO semble inactif (135). Une étude a aussi montré que le complexe DMDO pouvait, à pH acide, catalyser l'échange peptidique (136). Le pH acide pourrait donc lever l'effet inhibiteur de DO. Il ne faut pas exclure la possibilité que la catalyse fut effectuée par DM seul, s'étant libéré du complexe DMDO en raison du pH acide. On ignore si l'effet du pH est dû à une dissociation du complexe DO-DM ou un changement de conformation de DO ou DM ne dissociant pas ce complexe. Le changement de conformation du complexe DO-DM à pH acide serait dû à un changement sur DO, et possiblement sur DM (136). La dissociation du complexe à pH acide mènerait forcément à une forte dégradation de DO au niveau des lysosomes en raison de son instabilité. Cette hypothèse n'est pas supportée par les études montrant une copécipitation DM-DO (103), à moins que la dissociation du complexe DM-DO soit suffisamment lente pour permettre la détection du complexe. Enfin, l'existence de complexes DM-DO-DR a été démontrée (81). Par ce complexe, DO pourrait favoriser l'association de peptides de plus haute stabilité.

Chez la souris, une étude relève que H2-O peut affecter de manière positive, neutre ou négative la présentation de peptides internalisés après liaison au BCR, en fonction de la spécificité du récepteur membranaire utilisé ou des épitopes utilisés (137). Les études *in vivo* n'ont pas révélé de rôle activateur ou inhibiteur précis de H2-O, mais H2-O semble par contre favoriser la présentation de peptides internalisés par liaison à un récepteur membranaire (138;139). Une déficience en H2-OA favorise la présentation d'antigènes internalisés par endocytose non sélective (en phase fluide) (136); chez les souris de type sauvage, ces antigènes sont mieux présentés quand ils sont internalisés par une immunoglobuline membranaire transgénique.

#### **1.3.2.6.1 Modification du répertoire peptidique présenté**

Les cellules exprimant DO présentent un répertoire peptidique différent des cellules n'exprimant pas DO (134;135). La présence ou l'absence de DO modifie 20% du répertoire de peptides présentés (135). Ce phénomène pourrait être expliqué par l'action du pH sur DO. Puisque DO agit au pH peu acide retrouvé dans les endosomes ou les lysosomes précoces, mais n'agit pas dans les lysosomes, il favoriserait la présentation des peptides internalisés avec le récepteur de cellules B (**figure 1.15**). En effet, l'internalisation du peptide lié au récepteur membranaire entraîne la protection du peptide par le récepteur, jusqu'à la dégradation dans le lysosome (140). D'ailleurs, les complexes antigène-BCR persisteraient longtemps dans les endosomes tardifs (126). Ainsi, dans les endosomes, l'antigène internalisé par un BCR est protégé par ce récepteur et donc il n'est pas disponible pour être dégradé et se lier à la niche peptidique de DR. Donc, dans les endosomes, les peptides prêts à être présentés sont ceux qui ont été internalisés par endocytose de phase fluide. À ce niveau, DO est actif et se charge d'empêcher l'échange peptidique au niveau de DR. Dans les lysosomes, le récepteur membranaire est dégradé et libère l'antigène qui lui était associé; cet antigène deviendra disponible pour DR. À ce moment, DO est inactif, donc DM

est actif et peut catalyser l'échange d'un peptide de la niche peptidique contre le peptide internalisé avec le récepteur de cellule B.



**Figure 1.15 Modèle d'action de DO au niveau des différents compartiments endo-lysosomaux** La capture d'antigènes à partir du milieu extracellulaire peut se faire par endocytose de phase fluide (bleu) ou par liaison aux immunoglobulines (Ig) de surface (rouge). Les antigènes sont dénaturés et dégradés en peptides antigéniques dans les endosomes précoces (EP), tardifs (ET) et lysosomes (Lys). Les antigènes internalisés par endocytose à phase fluide sont plus rapidement disponibles pour occuper la niche peptidique que ceux internalisés via les Ig de surface : les premiers sont dégradés rapidement, tandis que les seconds sont protégés de la dégradation dans les EP et les ET par les Igs de surface. Dans les endosomes précoces et tardifs, DO inhibe DM; CLIP occupe la niche peptidique. Dans les lysosomes, le pH acide lève l'inhibition de DO sur DM et CLIP est remplacé par des peptides antigéniques.

### 1.3.2.7 Importance de DO in vivo

Chez la souris, l'absence de H2-O a mené à de nombreux effets, outre la modification du répertoire peptidique présenté. Les souris déficientes en H2-Oa n'ont toutefois pas montré de différence de proportion de cellules B, T CD4+ et T CD8+ dans le thymus, les ganglions lymphatiques ou la rate (138). Les souris

génétiqnement modifiées pour ne plus exprimer H2-O subissent une altération de leur capacité à monter une réponse humorale face à divers peptides (141). Leur production d'anticorps est faible et lente. Les CPA H2-O<sup>-/-</sup> présentent très peu d'antigènes d'origine exogène, et très peu de CLIP. En vieillissant, les souris H2-O<sup>-/-</sup> produisent des anticorps dirigés contre des substances du noyau, notamment l'ADN double brin; ceci suggère qu'une déficience en H2-O permet la présentation de peptides du soi et les réactions auto-immunes. Par ailleurs, en vieillissant, les souris H2-O<sup>-/-</sup> finissent par produire davantage d'IgG1 (138).

Pour l'instant, on n'a pas répertorié chez l'humain de maladies associées à une déficience génétique de DO; toutefois, les sujets atteints pourraient être classés dans l'immunodéficience variable commune, qui regroupe des maladies aux causes très diverses (141).

### **1.3.2.8 Autres rôles de DO**

Entre autres rôles, il a été proposé que DO puisse induire la tolérance immunitaire (142). L'inhibition de DM par DO permet la présentation d'un plus large spectre de peptides, incluant les peptides du soi. DO peut par exemple empêcher DM de catalyser la dissociation d'un peptide de faible affinité qui, en absence de DO, n'aurait pu être présenté. Ainsi, chez les CPA impliquées dans la tolérance, l'expression de DO revêt une importance capitale. D'ailleurs, une réaction lymphocytaire mixte a démontré que les DC H2-O<sup>-/-</sup> stimulaient davantage la prolifération de cellules T allogéniques que les DC exprimant H2-O (113).

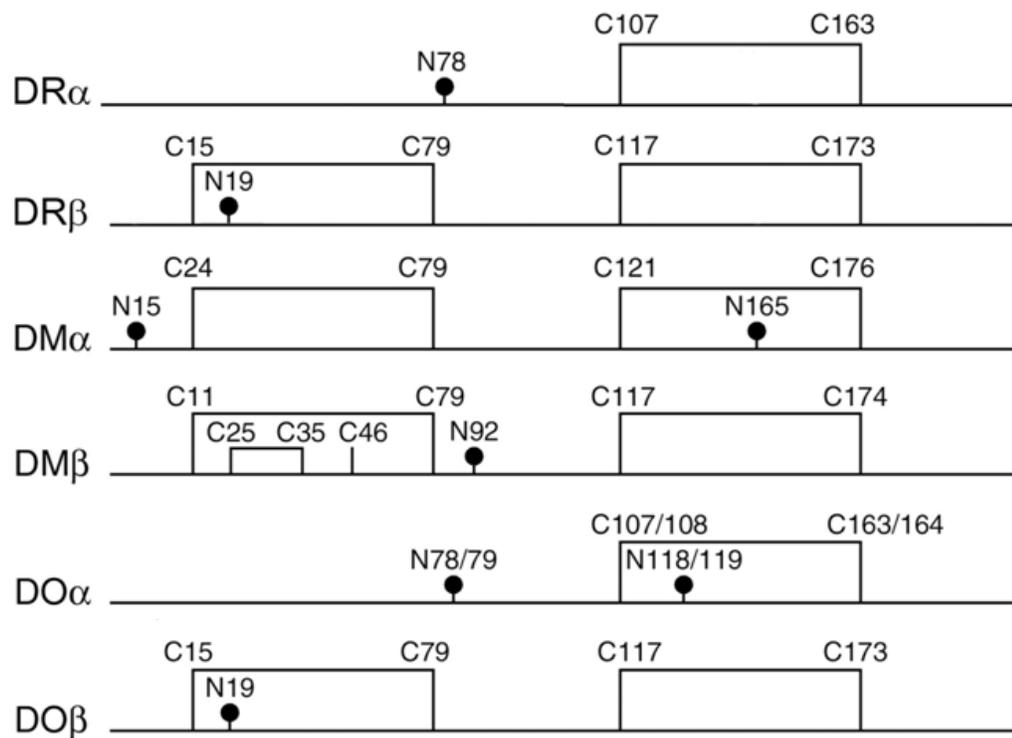
## **1.4 Repliement général des protéines dans le RE**

Il est généralement accepté que le RE constitue un milieu oxydé nécessaire à la formation des ponts disulfures (143). Des chaperons tels BiP, la calnexine et la calréticuline assistent au repliement des protéines synthétisées (144). BiP et la calnexine participent aussi au contrôle de la qualité, en contribuant à guider les protéines mal repliées vers le système ERAD (dégradation associée au RE) (145-

147). Les chaperons semblent faire partie de complexes incluant des enzymes redox, entre autres responsables de la formation de ponts disulfures (144). De plus, les molécules du CMH de classe II lient la calnexine (148;149) et, en absence de Ii, lient BiP (150), ERp72 et GRP94 (33). Les chaînes DR $\beta$  non assemblées peuvent être liées par les chaperons tels BiP avant d'être menées à la dégradation (151). GRP94 et ERp72 pourraient participer à la rétention au RE de molécules du CMH-II (33). Il n'a toutefois pas été démontré que DO liait ces chaperons.

L'importance des ponts disulfures pour le CMH de classe I a été mise en évidence. La mutation de la cystéine 103 du domaine  $\alpha 2$  chez H2-L<sup>d</sup> a empêché la liaison à la  $\beta 2$ -microglobuline et l'expression de surface de la glycoprotéine, en plus de perturber les changements de conformation normalement induits par la liaison du peptide (152). La mutation de la cystéine C203 formant le pont disulfure conservé C203-C259 du troisième domaine externe de H2-L<sup>d</sup> a mené à une perte d'expression de surface due à un problème conformationnel (153).

Les molécules du CMH-II comptent des ponts disulfures conservés dans les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$ , nécessaires pour former un domaine de type de la super famille des immunoglobulines, en plus d'un pont disulfure additionnel sur  $\beta 1$ , qui relie le plancher de la niche peptidique à l'hélice  $\alpha$  formant le côté de la niche (**figure 1.16**). La mutation de la cystéine 79 de DM $\beta$  a entraîné la formation d'un dimère dont les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont liées par un pont disulfure. Ce dimère est sujet à la rétention dans le RE et à une dégradation rapide (154). Par rapport aux autres molécules du CMH-II, DM possède un pont disulfure additionnel sur la chaîne  $\alpha$ , C24-C79 (**figure 1.16**), impliquant des résidus à des positions rappelant celles du pont disulfure conservé sur les chaînes  $\beta$  des molécules du CMH-II. DM possède un autre pont disulfure sur la chaîne  $\beta$ , C25-C35, qui relie deux segments du feuillet  $\beta$  de la niche peptidique. Le pont disulfure C25-35 de la chaîne  $\beta$ , unique à DM, est nécessaire à l'oxydation adéquate de la chaîne  $\alpha$  (sans être nécessaire pour l'hétérodimérisation) et la sortie du RE (155). Notons que la chaîne  $\alpha$  de DM empêche la formation d'un dimère  $\beta\beta$ .



**Figure 1.16 Emplacement des cystéines et ponts disulfures potentiels chez les molécules du CMH de classe II**

Les cystéines de DR, DM et DO sont représentées. Les traits reliant deux cystéines indiquent un pont cystéine potentiel. Un pont disulfure est conservé dans les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$ . Par ailleurs, DM $\alpha$  possède un pont disulfure (C24-C79) non retrouvé chez les autres chaînes  $\alpha$ ; DM $\beta$  possède trois cystéines non retrouvées chez les autres chaînes  $\beta$  (C25, C35, C46). C25 et C35 forment un pont disulfure unique à DM $\beta$ . Sur la figure sont également représentés les sites de glycosylation, marqués par un cercle. (Adapté de (155))

L'importance des ponts disulfures uniques à DM pourrait expliquer en partie pourquoi DM peut sortir du RE sans lier une autre molécule. DO et les molécules classiques du CMH-II ne peuvent sortir d'elles-mêmes du RE.

### 1.5 Objectifs et hypothèses de travail

La présentation antigénique est régulée par HLA-DM qui, elle, est régulée par HLA-DO. Le mécanisme d'action de DO est pour l'instant partiellement compris. La détermination de la structure cristalline de DO pourrait répondre à de

nombreuses interrogations concernant sa fonction et sa liaison avec DM. Des tentatives de production du cristal de DO ont échoué, en raison de sa faible production en cellules d'insectes. La conformation de DO, qui cause sa rétention dans le RE, explique probablement cette faible production. La liaison à DM permet à DO de sortir du RE, probablement en corrigeant sa conformation. L'obtention du mutant DOP11V, dans lequel la proline de la position 11 de DO $\alpha$  est mutée en valine, a partiellement corrigé la conformation de DO, comme en témoigne son expression de surface. Toutefois, l'expression de DOP11V en cellules d'insectes s'est elle aussi avérée insuffisante pour effectuer des expériences de cristallisation (Daved Fremont, communication personnelle). Nous avons donc tenté de modifier la conformation de DO. DM peut sortir du RE sans avoir à lier d'autres molécules, ce qui semble dû à des ponts cystéines qui lui sont uniques. Nous croyons que l'introduction sur DO de cystéines pour former des ponts disulfures similaires à ceux de DM pourrait modifier la conformation de DO et permettre sa sortie du RE, de manière indépendante à DM. Nous avons introduit sur DO $\alpha$  et DO $\beta$  des cystéines par mutagenèse dirigée. Après avoir transfecté les mutants obtenus dans des cellules 293T, nous avons vérifié par cytométrie en flux l'expression de surface des mutants. De plus, pour permettre une plus grande traduction de DO, nous avons introduit une séquence de Kozak partielle sur DO $\alpha$  et DO $\beta$ , et étudié avec la cytométrie en flux son effet sur DO. Nous avons aussi voulu approfondir davantage les problèmes de production de DO en caractérisant l'instabilité de DO. Puisque DM sort DO du RE et que les chaperons du RE peuvent guider des protéines mal conformées vers le système de dégradation ERAD, nous croyons que l'effet stabilisateur de DM sur DO se traduit par un effet positif sur la quantité totale de DO. Ainsi, DM pourrait protéger DO de la dégradation. Nous avons étudié, par cytométrie en flux, la stabilité de DO en comparant son expression totale en absence et en présence de DM.

Par ailleurs, les ponts disulfures ont une importance capitale dans le repliement des glycoprotéines. Nous ignorons en quelles circonstances DO est

oxydée ou réduite. L'état d'oxydation de DO pourrait nous permettre de mieux caractériser le mécanisme de rétention de DO dans le RE. Ainsi, nous avons voulu étudier l'état d'oxydation de DO. Nous croyons que le repliement non optimal de DO, en absence de DM, pourrait se traduire par des conformations réduites ou partiellement oxydées de DO $\alpha$  et DO $\beta$ . Nous avons étudié par immunobuvardage de type Western le niveau d'oxydation de DO, en présence et en absence de DM.

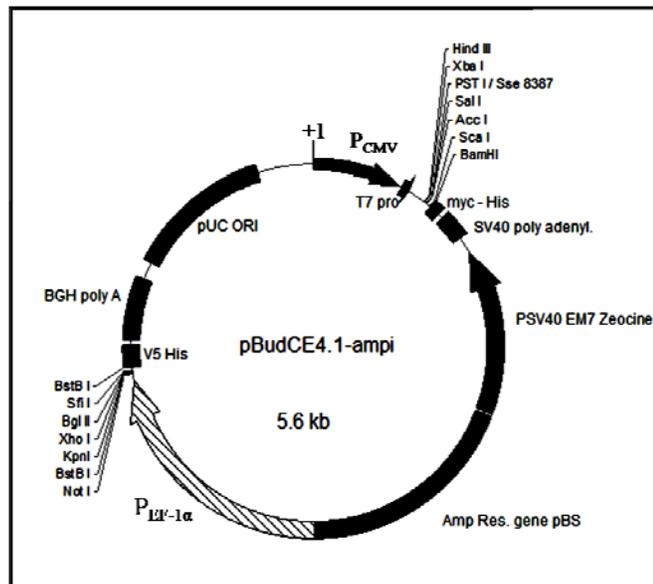
Enfin, la liaison DO-DM est peu caractérisée. Nous croyons qu'en plus du résidu  $\alpha$ E41, dont l'implication est connue, un résidu de la région  $\alpha$ 80-84 pourrait être impliqué dans la liaison DO-DM. Nous avons donc introduit des mutations dans cette région et vérifié par cytométrie en flux l'expression de surface de ces mutants transfectés dans des cellules 293T. Nous espérons que la caractérisation de l'interface de liaison DO-DM puisse contribuer à définir le mécanisme d'action de DO sur DM.

CHAPITRE 2  
MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'introduction de séquences de Kozak partielles (acc (positions -3 à -1) précédant la séquence atg (1 à 3)) et des différentes mutations furent réalisées par PCR, par mutagenèse dirigée.

## 2.1 Stratégies de clonage et PCR

Les plasmides pBudCE4.1-A, pBud DO (122), pBud DO41 et pBud DMY (111) ont déjà été décrits. Tous les plasmides pBud découlent de pBud CE4.1-A (**figure 2.1**). Le plasmide pBS KS+ DO $\beta$  provient de pBlueScript II KS+ (pBS KS+; Stratagene) auquel fut inséré le fragment DO $\beta$  du plasmide 45.1 DO $\beta$  par le site de restriction BamHI; le plasmide 45.1 DO $\beta$  a déjà été décrit (99).



**Figure 2.1** Carte de pBudCE4.1 ampI

pBud provient de pBudCE4.1 de Invitrogen auquel fut ajouté le gène de résistance à l'ampicilline tiré de pBS KS+ (Stratagene).

Les amorces utilisées pour le PCR sont décrites dans le **tableau I**. L'amorce A-DO $\alpha$  *Hind III* borde DO $\alpha$  en 5' et insère la séquence acc aux positions -3 à -1; l'amorce A-DO $\beta$  *KpnI* borde DO $\beta$  en 5' et insère la séquence acc aux positions -3

à -1. Ces amorces furent utilisées pour construire pBud acc-DO, dont l'expression cellulaire sera comparée à celle pBud DO, mais elles furent ensuite utilisées pour la construction des autres plasmides, de manière à augmenter l'expression de DO. Ces derniers ne porteront pas la mention « acc », pour simplifier la nomenclature.

**Tableau I : Liste complète des oligonucléotides utilisés pour les PCR**

Nom de l'amorce	Séquence de 5' en 3'	Mutation induite
A-DO $\alpha$ Hind III	ccg gcg <u>aa</u> g ctt acc atg gcc ctc aga gca ggg	---
D-DO $\alpha$ Xba I	gcc ggc tct aga tta cct ggg gac act gga	---
A-DO $\beta$ KpnI	gcg gcc ggt acc atg ggt tct ggg tgg gtc	---
D-DO $\beta$ Xho I	ccg gcg ctc gag tta gca tga ctg agg gag	---
DO $\alpha$ -Y14C-C	cgc ctt ctg cca gtc tta cgg	Y14C
DO $\alpha$ -Y14C-B	ccg taa gac tgg cag aag gcg	Y14C
DO $\alpha$ -I64C-C	ctggccggc tggccgcaatc	I64C
DO $\alpha$ -I64C-B	gattgccgc cagccggccag	I64C
DO $\beta$ -F30C/Y37C-C	tacgatc atctttaaactggaggagt tgtacg	F30C/Y37C
DO $\beta$ -F30C/Y37C-B	cgtacac actcctccaagttaaagatg atctga	F30C/Y37C
DO $\beta$ -F30C/Y38C-C	tcagatc atctttaaactggaggagtatt tgcgtt	F30C/V38C
DO $\beta$ -F30C/Y38C-B	aaacgacaataactcctccaagttaaagatg atctga	F30C/V38C
Universal	Gtaaacgacggccagt	---
Reverse	Aacagctatgaccatg	---
DO $\alpha$ -I84V-B	gaggcacgttga tggctctgctg	I84V
DO $\alpha$ -I84V-C	cagcagagcc tcaactgacctc	I84V
Mut.DO $\alpha$ -82RI/AT-A	ctccaaccgatggcagcca caactgccc	R82A I84T
Mut.DO $\alpha$ -82RI/AT-B	ggcacgttggctgccatcggttgag	R82A I84T

acc atg: sequence acc de Kozak, suivie du atg codant pour la méthionine de départ

tta: codon stop

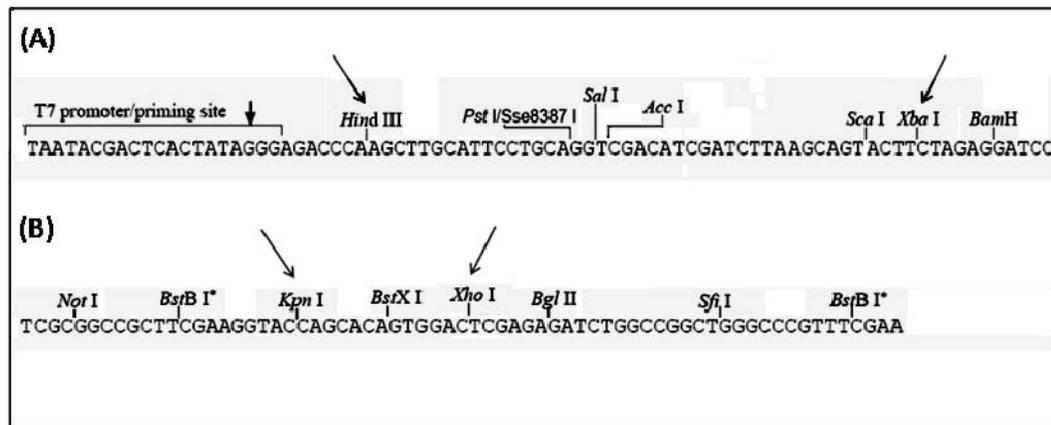
■ : nucléotides mutés

souligné: site de restriction introduit

Le plasmide utilisé pour tous les PCR fut pBud DO, sauf dans le cas du mutant DO $\beta$ -F30C/Y38C, dont le PCR fut fait sur pBS KS+ DO $\beta$  pour pallier à des difficultés rencontrées lors du clonage. Les mutations furent insérées par mutagenèse par extension chevauchante (156). De manière générale, pour

introduire une mutation, des fragments AB et CD étaient créés par PCR. Le fragment AB fut construit à partir de l'amorce A-DO $\alpha$  *Hind III* pour la chaîne  $\alpha$  et A-DO $\beta$  *KpnI* pour la chaîne  $\beta$  (dirigées 5' vers 3'), ainsi que l'amorce « B » (dirigée 3' vers 5') insérant la mutation désirée (par exemple, DO $\alpha$ -Y14C-B insère la mutation Y14C). Le fragment CD fut construit à partir de l'amorce D-DO $\alpha$  *Xba I* (chaîne  $\alpha$ ) ou D-DO $\beta$  *Xho I* (chaîne  $\beta$ ), ainsi que l'amorce « C » (dirigée 5'-3') insérant la mutation. Ensuite, les amorces A et D étaient utilisées sur les fragments AB et CD pour produire le fragment AD, contenant les fragments DO $\alpha$  ou DO $\beta$  mutés. Le mutant DOP11V/Y14C/I64C nécessita une double construction; d'abord, la construction de DO $\alpha$ PV/Y14C, puis l'ajout sur ce fragment de la mutation I64C. Le mutant DO $\beta$ -F30C/Y38C a quant à lui nécessité l'utilisation des amorces *Universal* et *Reverse*.

Dans pBud, les chaînes  $\alpha$  furent insérées sous le contrôle du promoteur de CMV de pBud via les sites de restriction *HindIII* / *Xba I*, et les chaînes  $\beta$  furent insérées sous le contrôle du promoteur EF-1 $\alpha$  via les sites *Kpn I* / *Xho I* (**figure 2.2**). En premier lieu, pBud acc-DO $\alpha$  et pBud acc-DO $\beta$  furent construits. Ensuite, le fragment DO $\beta$  fut introduit dans pBud DO $\alpha$  par sous-clonage (digestion *KpnI* / *Xho I*) pour former pBud acc-DO $\alpha$  acc-DO $\beta$  (pBud acc-DO). pBud acc-DO $\alpha$  et pBud acc-DO $\beta$  ont servi à la construction de tous les plasmides. En effet, pour tous les plasmides construits par la suite, pour obtenir le dimère  $\alpha\beta$ , les fragments obtenus par PCR furent insérés directement dans le vecteur pBud contenant la chaîne complémentaire, c'est-à-dire pBud acc-DO $\alpha$  ou pBud acc-DO $\beta$ . Seule exception, DO $\beta$  F30C/Y37C fut cloné dans pBud CE4.1-A (figure 2.1). pBud DO $\alpha$  DO $\beta$  F30C/Y37C fut ensuite obtenu par sous-clonage.



**Figure 2.2 Sites de multiclonaage de pBudCE4.1**

(A) Section du site de multiclonaage sous le contrôle du promoteur CMV. (B) Section du site de multiclonaage sous le contrôle du promoteur EF-1 $\alpha$ . Les sites de restriction marqués par une flèche sont ceux utilisés pour les clonages des chaînes DO $\alpha$  (A) et DO $\beta$  (B). Tiré de Invitrogen.com

([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pbudce4\\_1\\_mcs.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pbudce4_1_mcs.pdf))

### 2.1.1 Stratégie de clonage des mutants cystéines

Pour trouver les positions d'acides aminés de DO qui pourraient former des ponts disulfures semblables à ceux uniques à DM, nous avons utilisé la structure tridimensionnelle de DQ comme modèle théorique de DO. L'identification des positions des acides aminés des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de DQ à muter en cystéines fut effectuée en comparant les structures tridimensionnelles de ces molécules à celles de DM $\alpha$  et DM $\beta$ . Les structures tridimensionnelles des molécules furent acquises sur RCSB Protein Data Bank. Les structures utilisées, obtenues par cristallographie à rayon X, furent visualisées sur Protein Workshop. Il s'agit de HLA-DQ2 (1s9v; chaînes DQ3 $\alpha$  et DQ1 $\beta$ ), résolue par Kim et al. (157), et HLA-DM (2bc4), résolue par Nicholson et al. (91).

## 2.2 Transformation bactérienne

Les bactéries *Escherichia coli* compétentes furent dégelées sur glace. À 25  $\mu$ L de bactéries compétentes était ajouté 10  $\mu$ L de solution de ligation comprenant le plasmide théoriquement ligué. Le tout était délicatement mélangé au vortex, puis

reposait 30 minutes sur glace. Ensuite, un choc thermique était induit à 42°C pendant 90 secondes, puis les tubes reposaient 5 minutes sur glace. Un mL de milieu 2YT étaient ajoutés, pour incubation 1 heure à 37°C avec agitation. Les bactéries étaient ensuite transférées sur des pétris contenant de l'agar 2YT et ampicilline 100 µg/mL.

### **2.3 Lignées cellulaires et transfections**

La lignée 293T a été utilisée pour les transfections. Les cellules furent cultivées dans du milieu DMEM (Wisent) enrichi de 5% FBS (sérum foetal de bœuf; Wisent), à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Les transfections furent effectuées selon la méthode de précipitation au phosphate de calcium (158) avec 6 µg de chaque plasmide utilisé. Dans des pétris de culture cellulaire étaient ajoutés 1,5 millions de cellules 24h avant la transfection, ou 2 millions de cellules 5 heures avant la transfection. Seize heures après la transfection, le milieu était renouvelé.

### **2.4 Anticorps**

Les anticorps utilisés furent les suivants : HKC5, un anticorps reconnaissant la queue cytoplasmique de DOβ; L243 (IgG2a), qui lie un déterminant conformationnel spécifique de DRα; et le sérum de lapin anti-DOα ont tous été produits à notre laboratoire et ont été décrits précédemment (120;122;159). Mags.DO5 (IgG1) est un anticorps reconnaissant un épitope conformationnel sur DOβ (116;160) (fourni par Lisa K. Denzin). Map.DM1 est un anticorps conformationnel liant la partie luminale de DM (161) (fourni par Lisa K. Denzin). L'anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de souris conjugué à Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) est utilisé comme anticorps secondaire.

### **2.5 Cytométrie en flux**

Les cellules récoltées après deux lavages au PBS étaient fixées à la paraformaldéhyde (PFA) 2% pendant 25 minutes. Le NH<sub>4</sub>Cl 50mM fut utilisé

pour neutraliser la PFA. Pour le marquage total, les cellules étaient perméabilisées à l'aide de 0.05% saponine et 1% BSA dans du PBS 1X (122). Les cellules étaient incubées 30 minutes avec l'anticorps dans 100 µL de PBS 1X dans et 1% BSA (plus 0.05% saponine pour les marquages totaux). Après deux lavages au PBS, les cellules étaient incubées 30 minutes dans du PBS 1X, 1% BSA, à l'abri de la lumière. Après deux lavages au PBS, les cellules étaient resuspendues dans 300 µL de PBS et analysées au FACSCalibur (Becton Dickinson, USA)

## **2.6 Lyse cellulaire, immunobuvardage de type Western et digestion à l'endoglycosidase H**

Les cellules étaient récoltées dans du PBS, lavées au PBS, puis lysées 30 minutes à 4°C dans du tampon de lyse (Tris 20mM pH7.5, 150mM NaCl) contenant 1% Triton X-100 (122) en présence d'inhibiteurs de protéase (Roche Diagnostics, Canada). Les échantillons étaient ensuite resuspendus dans du tampon Laemli réducteur (2-mercaptoéthanol) ou non réducteur, puis bouillis 5 minutes et chargées sur un gel SDS 10%. Ensuite, les protéines étaient transférées sur une membrane Hybond ECL (Amersham, Canada), et incubées pendant la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire, HKC5 ou lapin anti-DO $\alpha$ . L'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (GAM-PO; Jackson ImmunoResearch) ou l'anticorps de chèvre anti-lapin conjugué à la peroxydase (GAR-PO; Jackson ImmunoResearch), fut utilisé 1h à température pièce. Les membranes furent développées sur des films FUJI Medical X-Ray Film (Fujifilm) par chemiluminescence. Pour la digestion à l'endoglycosidase H (endoH), un lysat contenant  $1,5 \times 10^5$  cellules fut traité 1h à 37°C par l'EndoH (New England Biolabs, Canada), avant d'être resuspendu dans un tampon Laemli 5X contenant du 2-mercaptoéthanol. Les lysats furent ensuite bouillis 5 minutes et analysés par immunobuvardage de type Western comme précédemment décrit.

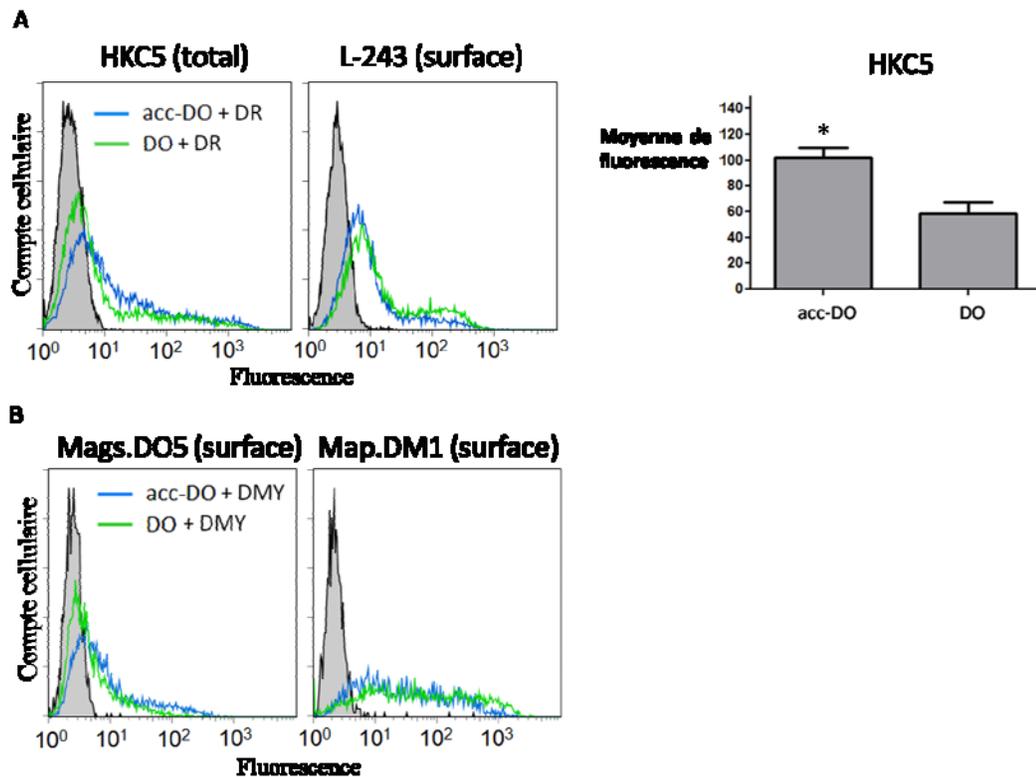
CHAPITRE 3  
RÉSULTATS

### 3.1 Expression de DO

#### 3.1.1 Optimisation de la traduction de DO

La cristallisation de DO nécessitera la production à grande échelle de cette molécule. Pour y parvenir, outre l'amélioration de la stabilité de DO, il convient d'augmenter la traduction de cette protéine. Nous avons inséré une séquence partielle de Kozak (162). Les nucléotides *acc* ont été insérés immédiatement en amont des nucléotides *atg* codant pour les méthionines de départ de DO $\alpha$  et DO $\beta$  pour se conformer au consensus de Kozak. Il n'était pas possible d'ajouter un des nucléotides consensus, situé à la position 4, en aval du codon *atg* de la méthionine de départ, sans altérer la séquence primaire de DO.

L'expression de ce pBud *acc*-DO $\alpha$  *acc*-DO $\beta$  (que nous nommerons *acc*-DO) a été comparée à celle de DO, également exprimée à l'aide de pBudCE4.1. Des cellules 293T ont été transfectées avec *acc*-DO ou DO, en plus de DR. Les cellules ont subi un marquage de surface avec L243 (anti-DR) ou furent perméabilisées à la saponine avant de les marquer avec HKC5 (anti-DO $\beta$ ). On remarque une meilleure expression avec *acc*-DO par rapport à DO (**Figure 3.1A**), soit une augmentation de près de 75% de l'intensité moyenne de fluorescence en HKC5. La co-transfection de DR constitue un contrôle positif permettant de comparer l'efficacité des transfections. Puisque HKC5 ne vérifie que l'expression de DO $\beta$ , nous avons voulu vérifier l'expression de DO $\alpha\beta$ . Mags.DO5 fut utilisé en marquage de surface sur des cellules 293T transfectées avec *acc*-DO ou DO, en présence de DMY. DMY consiste en DM dépossédé de son motif YPTL de localisation aux lysosomes; il est exprimé en surface et sa liaison à DO permet l'expression de surface de DO (111). L'ajout de DMY a permis de constater une expression de surface de *acc*-DO qui semble supérieure à celle de DO (**figure 3.1B**). Toutefois, il serait nécessaire de répéter l'expérience plusieurs fois pour conclure si l'augmentation d'expression est statistiquement significative.

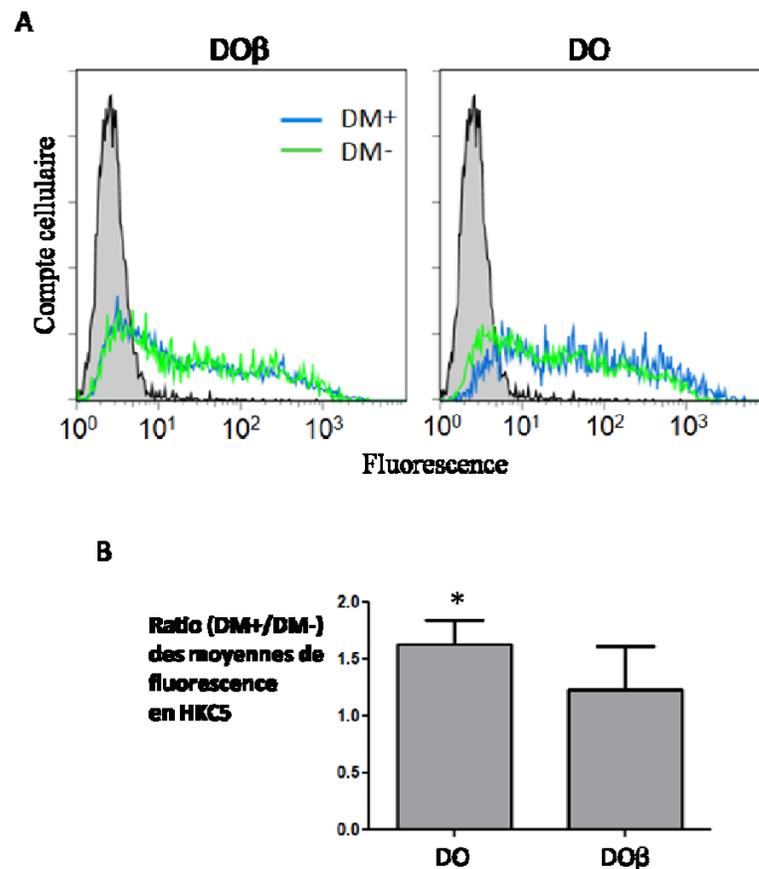


**Figure 3.1 : La séquence de Kozak partielle *acc* augmente l'expression de DO**

(A) *Panneau de gauche* : Des cellules 293T transfectées avec pBud DO ou pBud acc-DO et pBud DR ont été marquées avec HKC5 (marquage total) ou avec L243 (marquage de surface), suivi de l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à Alexa 488, et ont été analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes pleins représentent le contrôle négatif effectué avec des cellules transfectées avec pBudCE4.1-A. *Panneau de droite*: Les résultats avec le marquage HKC5 de trois expériences indépendantes ont été compilés (\*P = 0,022, test t de Student bilatéral à échantillons indépendants). Les histogrammes à barre ont été construits en calculant les moyennes  $\pm$  SEM (B) Des cellules 293T transfectées avec pBud DO ou pBud acc-DO, en présence de pBud DM, ont été marquées en surface avec Mags.DO5 ou Map.DM1, suivi de l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à Alexa 488, et ont été analysées par cytométrie en flux. L'expérience a été faite une seule fois.

### 3.1.2 Stabilité de DO

Pour produire de grandes quantités de DO, il est important que la molécule demeure la plus stable possible et puisse sortir du RE. Puisque DM stabilise DO et abolit sa rétention dans le RE, il est plausible qu'en présence de DM, de moins grandes quantités de DO soient sujettes à la dégradation associée au RE (système ERAD). Nous croyons que cela se traduirait par une augmentation significative de la quantité totale de DO dans la cellule. Nous avons comparé l'expression de DO en présence et en absence de DM. Nous avons transfecté des cellules 293T avec DO ou DO $\beta$ , en présence ou en absence de DM. Nous avons perméabilisé les cellules à la saponine et les avons marquées avec HKC5. Les cellules exprimant seulement DO $\beta$  constituent un contrôle : puisque DM ne devrait pas lier la chaîne DO $\beta$  isolée, l'expression de DO $\beta$  ne devrait pas être influencée par la stabilisation induite par DM. L'expression de DO fut effectivement augmentée en présence de DM (**figure 3.2 A et B**). En effet, on note que la fluorescence en HKC5 est plus élevée en présence de DM. La hausse représente environ 60% (**Figure 3.2B**). Quant à l'expression de DO $\beta$  en absence de DO $\alpha$ , elle semble peu influencée par DM, bien que les résultats étaient moins reproductibles qu'avec DO (**Figure 3.2B**). Bref, DM semble favoriser l'expression totale de DO.



**Figure 3.2 : Influence de DM sur l'expression totale de DO**

(A) Des cellules 293T furent transfectées avec pBud DO ou pBud DO $\beta$ , en présence ou non de pBud DM. Les cellules furent perméabilisées et marquées avec HKC5, suivi de l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à Alexa 488, et furent analysées par cytométrie en flux. (B) Les résultats de sept expériences indépendantes ont été compilés (\*P = 0,030, test t de Student bilatéral à échantillons indépendants). Les histogrammes à barre ont été construits en calculant les moyennes des ratios  $\pm$  SEM

### 3.2 Conformation de DO

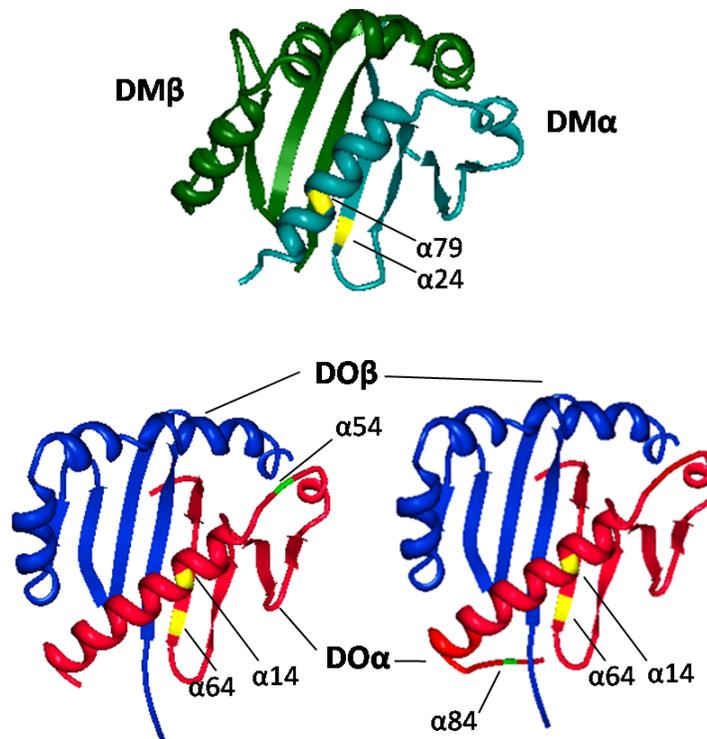
Le principal problème concernant les tentatives d'expression à grande échelle de DO réside dans sa conformation, qui rend la molécule instable et dépendante de DM pour sortir du RE. Ainsi, pour tenter d'améliorer la conformation de DO,

nous avons constitué des mutants de DO en introduisant des cystéines à des positions semblables sur DO $\alpha$  ou DO $\beta$  à celles des cystéines formant un pont disulfure unique à DM $\alpha$  ou DM $\beta$ . Puisque la séquence de DQ2 possède de fortes similitudes avec celle de DO, nous avons utilisé la structure tridimensionnelle de DQ2 pour représenter DO. La comparaison des structures tridimensionnelles de HLA-DM et HLA-DQ2 a désigné les résidus à modifier sur la chaîne  $\alpha$  et la chaîne  $\beta$  de DO comme sites potentiels d'introduction de cystéines pour obtenir des ponts disulfures semblables à ceux trouvés chez DM. Nous avons entrepris d'apporter chez DO les mutations pour les positions identifiées. Si la conformation d'un DO muté lui permet de sortir du RE, nous pourrions retrouver DO à la surface cellulaire.

### 3.2.1 Mutations de la chaîne DO $\alpha$

Le pont disulfure unique à DM $\alpha$  est le C24-C79. Ainsi, sur Protein Workshop, les cystéines  $\alpha$ C24 et  $\alpha$ C79 furent identifiées sur la structure tridimensionnelle de DM. Ensuite, des positions semblables sur DQ $\alpha$  furent identifiées. À noter : sur Protein Data Bank, la chaîne  $\alpha$  de HLA-DQ2 (code 1s9v) possède les positions 9a et 9b pour inclure l'acide aminé supplémentaire non trouvé sur DP et DR. Dans la séquence de DO, ils sont identifiés comme positions 9 et 10. Pour cette raison, tous les acides aminés situés en C-terminal de la position 9 sont décalés d'une position par rapport aux les acides correspondants sur DO $\alpha$ . Par exemple, la tyrosine majoritairement conservée Y14 retrouvée sur DO $\alpha$  est identifiée dans 1s9v comme étant Y13. Les mutants DO $\alpha$ P11V/Y14C/I64C/R54C (DO $\alpha$ PV/14/64/54) et DO $\alpha$ P11V/Y14C/I64C/I84V (DO $\alpha$ PV/14/64/84) ont été clonés dans pBud DO $\beta$ . Nous avons utilisé DO $\alpha$ P11V plutôt que DO $\alpha$ , car ce mutant montre déjà une conformation plus adéquate. Ainsi, les deux mutants construits expriment la valine en position 11, ce qui devrait également augmenter l'expression de surface de DO. Les mutations additionnelles R54C et I84V des deux mutants (**Figure 3.3**) constituent des mutations non désirées probablement dues à une perte d'activité de l'enzyme *Taq polymérase*. Ces mutations non

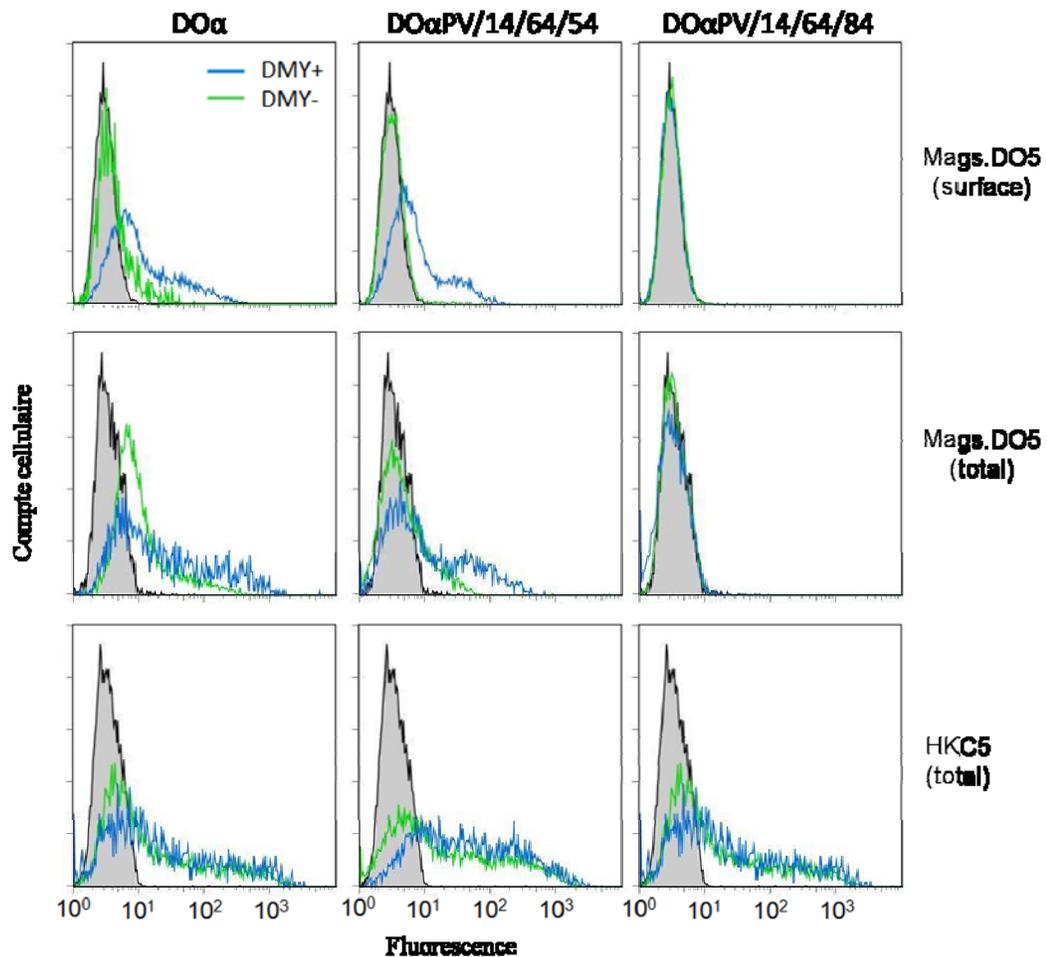
désirées pourraient influencer la conformation. Toutefois, R54 et I84 sont à des endroits éloignés l'un de l'autre; il est peu probable que les deux mutations modifient de manière identique un aspect de DO (conformation, liaison à DM).



**Figure 3.3 : Mutations obtenues sur la chaîne  $\alpha$  de DO visant à stabiliser DO**

À partir des cystéines formant le pont disulfure unique à DM $\alpha$  (représentées en jaune, panneau du haut), nous avons identifié, puis muté les acides aminés pouvant occuper des positions semblables sur DO $\alpha$  (en jaune, panneaux du bas). Sur chaque construction, nous avons toutefois obtenu une mutation additionnelle (représentée en vert), soit R54C (panneau en bas à gauche) ou I84V (panneau en bas à droite). Les mutations ont été induites à partir de DO $\alpha$ P11V (non illustré). Les mutants obtenus sont DO $\alpha$ PV/14/64/54 (panneau en bas à gauche) et DO $\alpha$ PV/14/64/84 (panneau en bas à droite). Ils furent clonés dans pBud DO $\alpha$ . La structure de DO est ici représentée par celle de DQ2. Images tirées de Protein data bank: 1s9v (DQ2) et 2bc4 (DM), et ajustées sur MBT Protein Workshop.

Des cellules 293T ont été transfectées avec pBud DO, pBud DO $\alpha$ PV/14/64/54+DO $\beta$  ou pBud DO $\alpha$ PV/14/64/84+DO $\beta$ , en présence ou non de DMY. Après un marquage en surface avec Mags.DO5, ou une perméabilisation à la saponine suivie d'un marquage total avec HKC5 ou Mags.DO5, les cellules ont été analysées en cytométrie en flux. L'expression de surface des mutants s'est avérée nulle et même, curieusement, inférieure à celle de DO, bien que cette dernière soit quasi nulle (**figure 3.4**). Ainsi, l'expression de surface de DO n'a pas été améliorée par la présence des cystéines. L'utilisation de DMY restaure l'expression de surface de DO, comme attendu (111). DMY a augmenté l'expression de surface et la liaison de Mags.DO5 (coloration totale) du mutant DO $\alpha$ PV/14/64/54; par contre, l'expression du mutant DO $\alpha$ PV/14/64/84 n'est pas rétablie par DMY : on ne retrouve aucune expression de surface, ni même de liaison à Mags.DO5 à l'intérieur des cellules. Ce mutant a possiblement perdu sa capacité de liaison à DMY; il pourrait avoir induit une modification de conformation qui ne permettrait plus à Mags.DO5 de reconnaître DO. Cette expérience fut toutefois réalisée une seule fois; il conviendrait de la réaliser à nouveau et s'assurer que les résultats sont reproductibles. L'introduction de cystéines aux positions Y14C et I64C de la chaîne DO $\alpha$  ne semble pas avoir corrigé la conformation de DO. Il est possible que les mutations 54 et 84 de DO $\alpha$  aient empêché ou masqué la correction de conformation visée.



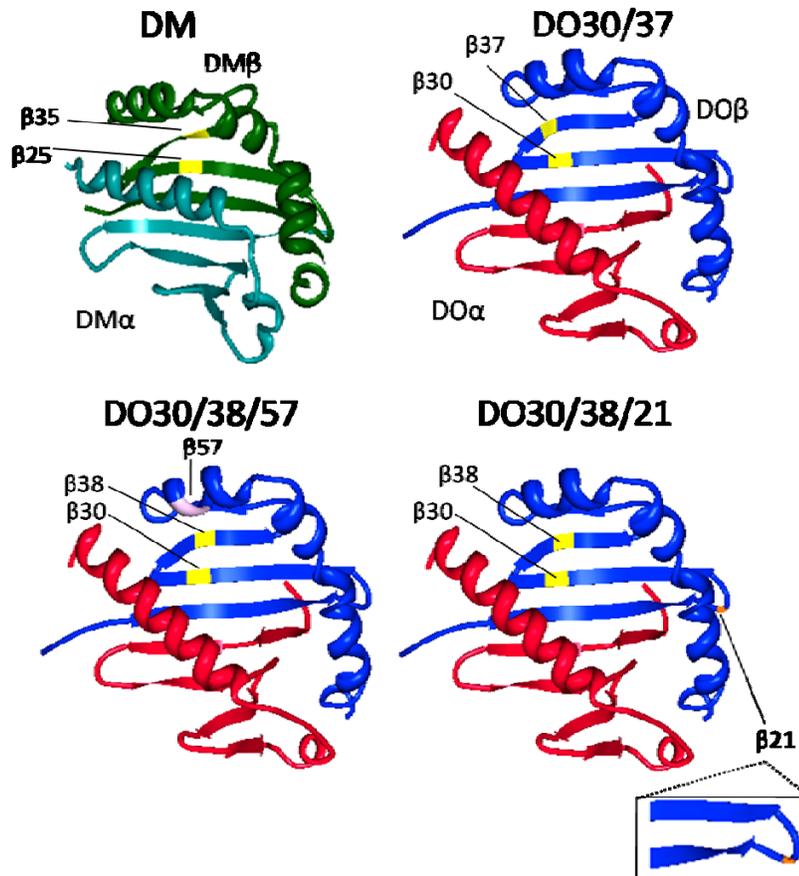
**Figure 3.4 : La mutation Y14C/I64C de la chaîne DO $\alpha$  ne corrige pas la conformation de DO**

Des cellules 293T ont été transfectées avec pBud DO $\alpha$  PV/14/64/54+DO $\beta$ , pBud DO $\alpha$ PV/14/64/84+DO $\beta$ , ou pBud DO $\alpha$ +DO $\beta$ , et furent co-transfectées ou non avec pBud DMY. Les cellules furent marquées avec HKC5 (marquage total) ou Mags.DO5 (marquage de surface ou total), suivi de l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à Alexa 488. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes pleins représentent le contrôle négatif effectué avec des cellules transfectées avec pBudCE4.1-A. L'expérience fut réalisée une seule fois.

### 3.2.2 Mutations de la chaîne DO $\beta$

Le pont disulfure unique à DM $\beta$  est le C25-C35. Sur Protein Workshop, les cystéines  $\beta$ 25 et  $\beta$ 35 furent identifiées sur la structure tridimensionnelle de DM.

Ensuite, les positions correspondantes furent identifiées sur DQ $\beta$ . Nous avons muté les acides aminés correspondants sur DO $\beta$ . Les mutants DO $\beta$ F30C/Y37C (DO $\beta$ 30/37), DO $\beta$  F30C/V38C/D57G (DO $\beta$ 30/38/57) et DO $\beta$ F30C/V38C/T21A (DO $\beta$ 30/38/21) (**Figure 3.5**) furent obtenus dans pBud DO $\alpha$ .



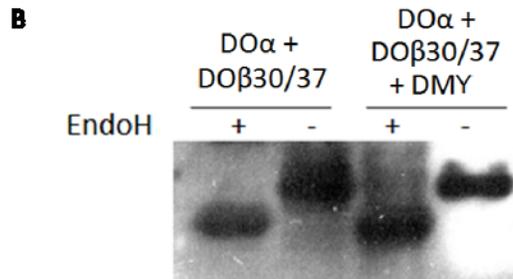
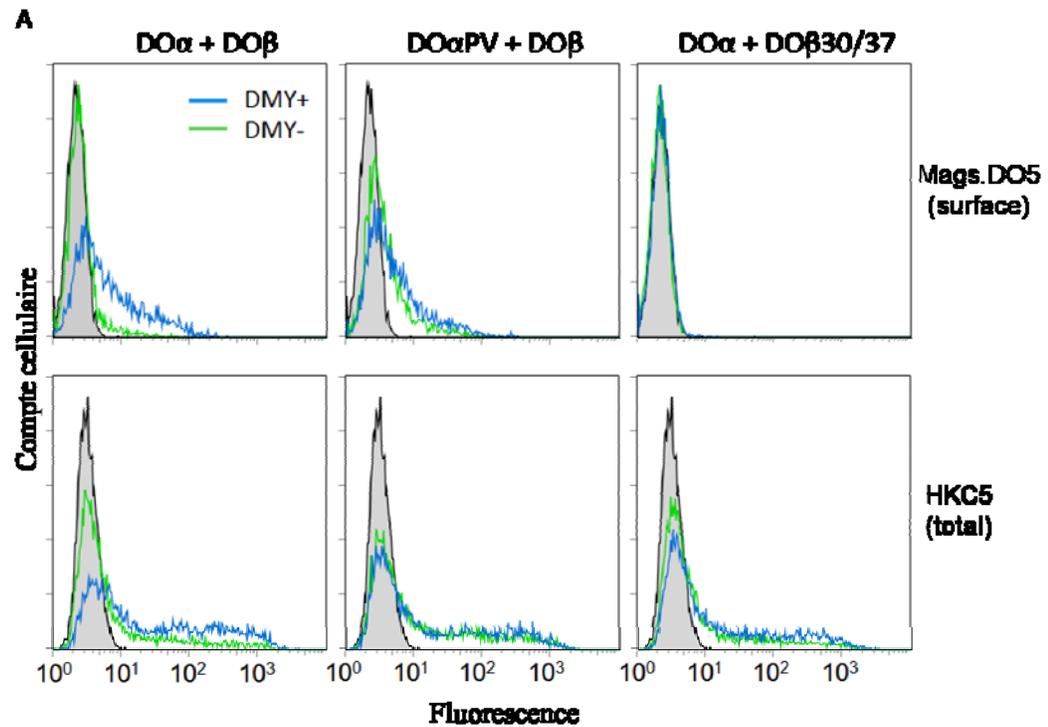
**Figure 3.5 : Mutations obtenues sur la chaîne  $\beta$  de DO visant à stabiliser DO**

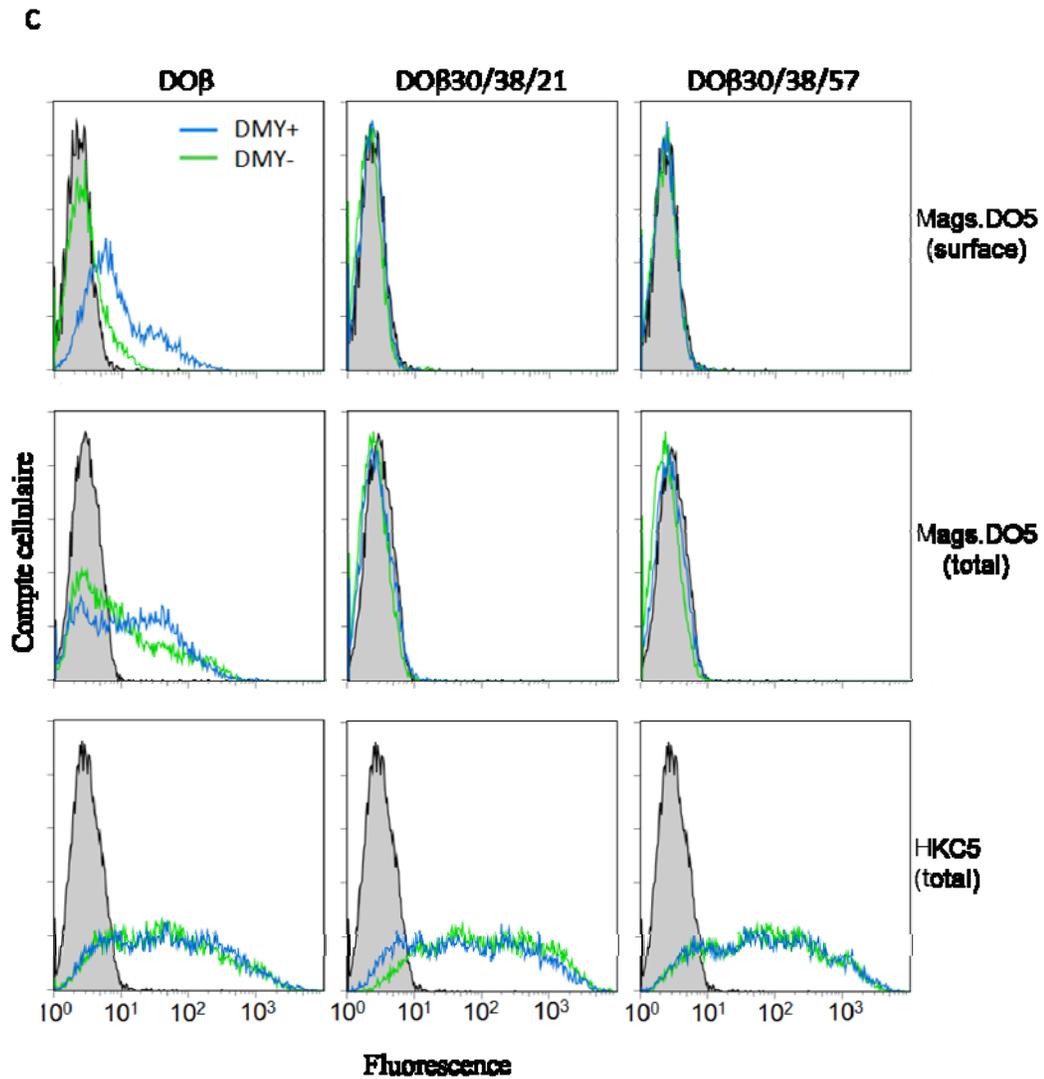
À partir des cystéines formant le pont disulfure unique à DM $\beta$  (représentées en jaune, panneau de gauche), nous avons identifié, puis muté les acides aminés pouvant occuper des positions semblables sur DO $\beta$  :  $\beta$ 30 et  $\beta$ 37 (panneau en haut, à droite) et  $\beta$ 30 et  $\beta$ 38 (panneaux du bas). Pour la mutants 30C-38C, nous avons toutefois obtenu une mutation additionnelle, sur deux constructions différentes : D57G (panneau en bas, à gauche) et T21A (panneau en bas, à droite). Les constructions obtenues sont DO $\beta$ 30/37, DO $\beta$ 30/38/21 et DO $\beta$ 30/38/57. Elles furent clonées dans pBud DO $\alpha$ . La structure de DO est ici représentée par celle de DQ2. Images tirées de Protein data bank: 1s9v (DQ2) et 2bc4 (DM), et ajustées sur MBT Protein Workshop.

Les mutations aux positions 57 et 21 des constructions DO $\beta$ 30/38/57 et DO $\beta$ 30/38/21, respectivement, sont des modifications introduites par la *Taq polymérase*. Des cellules 293T ont été transfectées avec pBud DO, pBud DO $\alpha$ P11V+DO $\beta$ , pBud DO $\alpha$ +DO $\beta$ 30/37, pBud DO $\alpha$ +DO $\beta$ 30/38/57 ou pBud DO $\alpha$ + DO $\beta$ 30/38/21, en présence ou non de DMY. Les cellules ont subi un marquage de surface avec Mags.DO5 ou ont été perméabilisées à la saponine et furent marquées avec Mags.DO5 (pour DO, DO $\beta$ 30/38/21 et DO $\beta$ 30/38/57) ou HKC5. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. DO $\beta$ 30/37 n'est pas exprimé en surface, comme le montre le marquage de Mags.DO5 de surface, contrairement au contrôle positif DO $\alpha$ PV+DO $\beta$  (**Figure 3.6A**). Bien que DO ne soit pas une molécule exprimée en surface, on peut apercevoir une très faible expression de surface, supérieure à celle du mutant DO $\beta$ 30/37. Par ailleurs, l'ajout de DMY augmente l'expression de surface de DO, comme déjà démontré (111); par contre, l'expression de surface de DO $\beta$ 30/37 n'est pas améliorée par DMY. La sensibilité au traitement à l'endoglycosidase H (EndoH) des cellules transfectées (**Figure 3.6B**) montre que DO $\beta$ 30/37 n'a pas subi la dernière étape de maturation de ses oligosaccharides dans l'appareil de Golgi. Ce mutant est donc confiné au RE. De plus, il n'acquiert pas la résistance à l'EndoH en présence de DMY; il aurait donc perdu sa capacité de lier DM. Il faudrait toutefois répéter cette expérience avec un contrôle positif constitué de DO de type sauvage. En présence de DM ou DMY, DO devrait acquérir la résistance à l'EndoH, puisque DM permet à DO de quitter le RE. Par ailleurs, les mutants DO $\beta$ 30/38/57 et DO $\beta$ 30/38/21 ne sont pas exprimés en surface (**figure 3.6C**). L'ajout de DMY ne corrige pas la situation; on ne retrouve pas ces DO mutés en surface et Mags.DO5 ne les reconnaît pas (marquage total). Les mutations cystéines ajoutées semblent nuire à la conformation de DO; il est possible que ces mutations abolissent la liaison entre DO et DMY. Puisque DO montre une certaine expression de surface, bien que faible, lorsqu'exprimé en absence de DMY, et que les mutants cystéines ne sont pas exprimés du tout, la conformation de ces mutants est certainement

altérée. Ceci n'exclut pas la possibilité que les sites de liaison à Mags.DO5 soient modifiés ou rendus inaccessibles. Des tests de co-précipitation DO-DM seraient nécessaires pour approfondir la question.

Figure 3.6; A-B





**Figure 3.6 : Les mutations F30C/Y37C et F30C/V38C de la chaîne DO $\beta$  ne corrigent pas la conformation de DO**

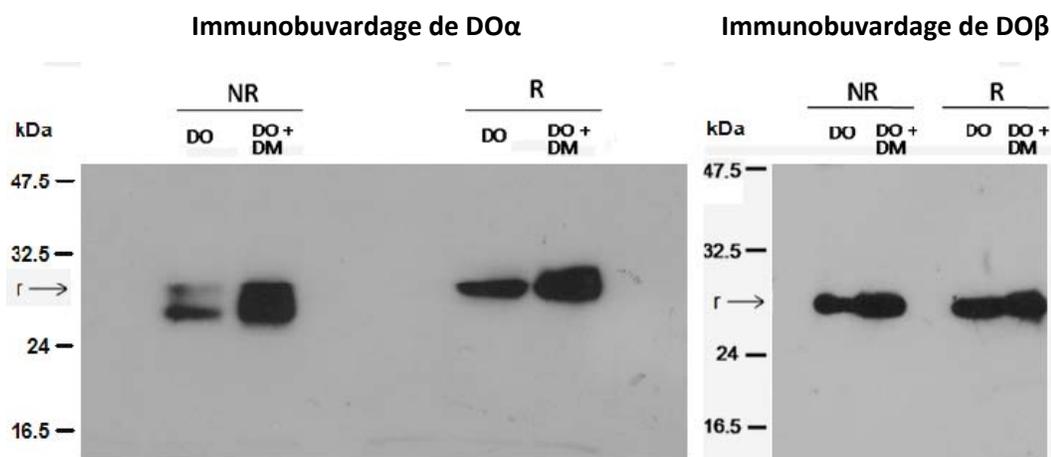
Des cellules 293T furent transfectées avec pBud DO, pBud DO $\alpha$ +DO $\beta$  F30C/Y37C ou pBud DO $\alpha$ P11V+DO $\beta$  (A) ou pBud DO, pBud DO $\alpha$ +DO $\beta$ 30/38/21 ou pBud DO $\alpha$ +DO $\beta$  30/38/57 (C), en présence ou non de pBud DMY. Elles furent marquées avec HKC5 (marquage total) ou Mags.DO5 (surface (A); surface et total (C)), suivi de l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à Alexa 488. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes pleins représentent le contrôle négatif effectué avec des cellules transfectées avec pBudCE4.1-A. Les résultats montrés en (A) et (C) sont chacun représentatifs de deux expériences indépendantes. (B) Les cellules décrites en (A) ont été lysées dans du Triton X-100 1% et ont subi une digestion à l'endoH, puis les lysats furent analysés par immunobuvardage de type Western. Le résultat montré est représentatif de deux expériences indépendantes.

### 3.3 Niveau d'oxydation de DO

Une étude de van Lith et Benham a démontré que, chez DM, le pont C25-C35 de DM $\beta$  est nécessaire à l'oxydation complète de DM $\alpha$  et la sortie de DM du RE (155). La rétention dans le RE causée par l'abolition du pont C25-C35 est probablement due à un défaut de conformation. On pourrait traduire le rôle des ponts disulfures par un « repliement oxydatif ». Par le fait même, nous croyons que la correction de conformation de DO par DM implique les ponts disulfures de DO. Ainsi, nous avons vérifié par immunobuvardage de type Western le profil d'oxydation de DO, en présence et en absence de DM. Nous déterminerons ainsi si DO possède des conformations réduites ou oxydées à différents niveaux. Le repliement de DO causé par un pont disulfure modifiera sa vitesse de migration. En conditions non réductrices, des bandes distinctes correspondraient donc vraisemblablement à des molécules ayant des états oxydatifs distincts. Pour DO $\alpha$ , on retrouve en conditions réductrices une bande unique correspondant à la conformation réduite. En conditions non réductrices, la chaîne DO $\alpha$  montre deux bandes distinctes, correspondant à des conformations différentes (**Figure 3.7**; panneau de gauche). Parmi les deux niveaux d'oxydation de DO $\alpha$  retrouvés en conditions non-réductrices, l'un correspond à l'état entièrement réduit (r) de DO, correspondant à la bande retrouvée en conditions réductrices. L'autre correspond à une molécule plus oxydée, donc ayant formé un pont disulfure. L'ajout de DM n'a pas modifié le profil d'oxydation observé. Ainsi, la correction de conformation de DO induite par sa liaison à DM ne semble pas impliquer de pont disulfure sur DO $\alpha$ . Il aurait été intéressant de quantifier l'intensité des deux bandes correspondant à deux niveaux d'oxydation différents retrouvés en conditions non réductrices. Toutefois, il fut difficile de bien séparer les deux bandes.

Quant à DO $\beta$ , on ne retrouve qu'une bande en condition non-réductrices (**figure 3.7**; panneau de droite); il s'agit de la même bande que celle retrouvée en

conditions réductrices. Ainsi, DO $\beta$  ne semble pas oxydée lorsqu'associée à DO $\alpha$ . L'ajout de DM a donné un résultat similaire. Ainsi, il semble que la correction de la conformation de DO induite par DM n'implique pas les ponts disulfures de DO $\beta$ . Enfin, il serait préférable de répéter l'expérience pour s'assurer que les résultats sont reproductibles.



### Figure 3.7 Niveaux d'oxydation de DO

Des cellules 293T ont été transfectées avec DO, avec ou sans DM. Les cellules récoltées ont été lysées, puis les protéines furent soumises à un immunobuvardage de type Western, en conditions réductrices ou non-réductrices. Le sérum de lapin anti-DO $\alpha$  et l'anticorps HKC5 furent utilisés pour détecter DO $\alpha$  (panneau de gauche) et DO $\beta$  (panneau de droite), respectivement. Les résultats montrés sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

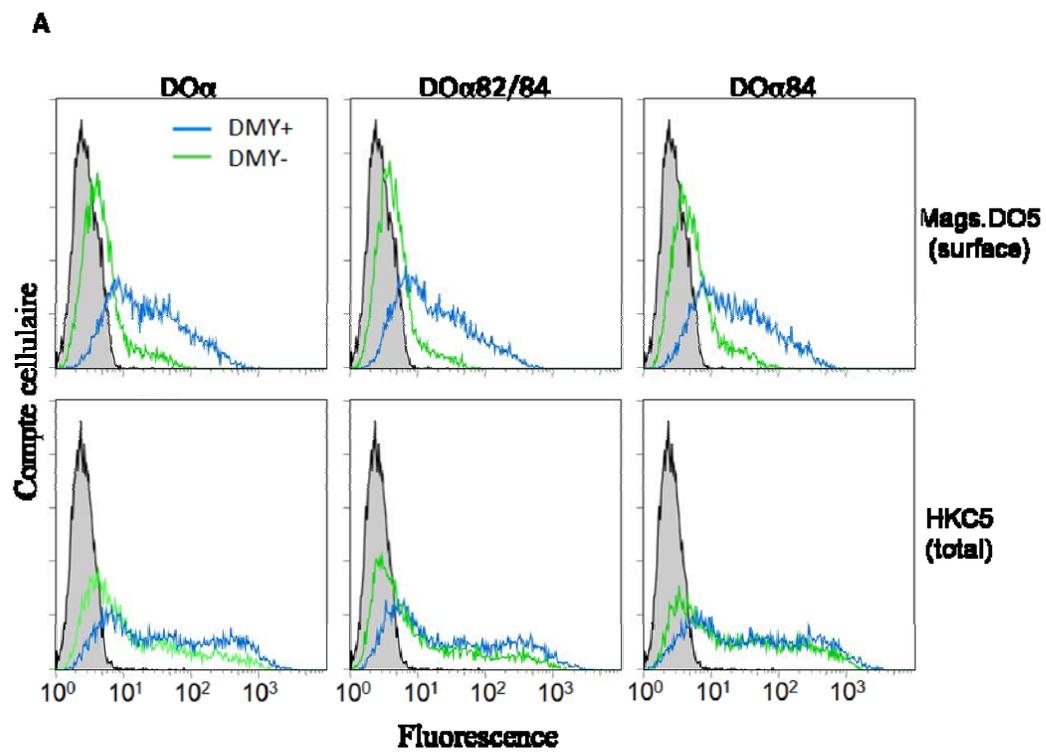
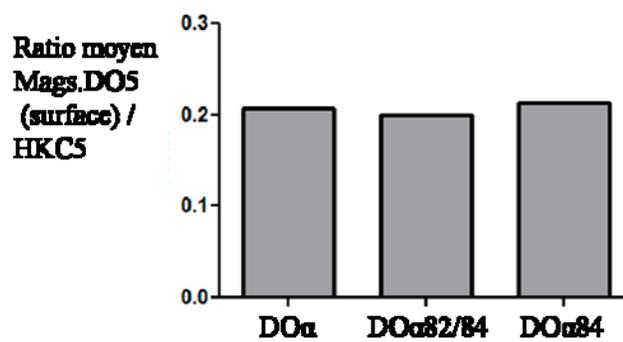
### 3.4 Liaison DO-DM

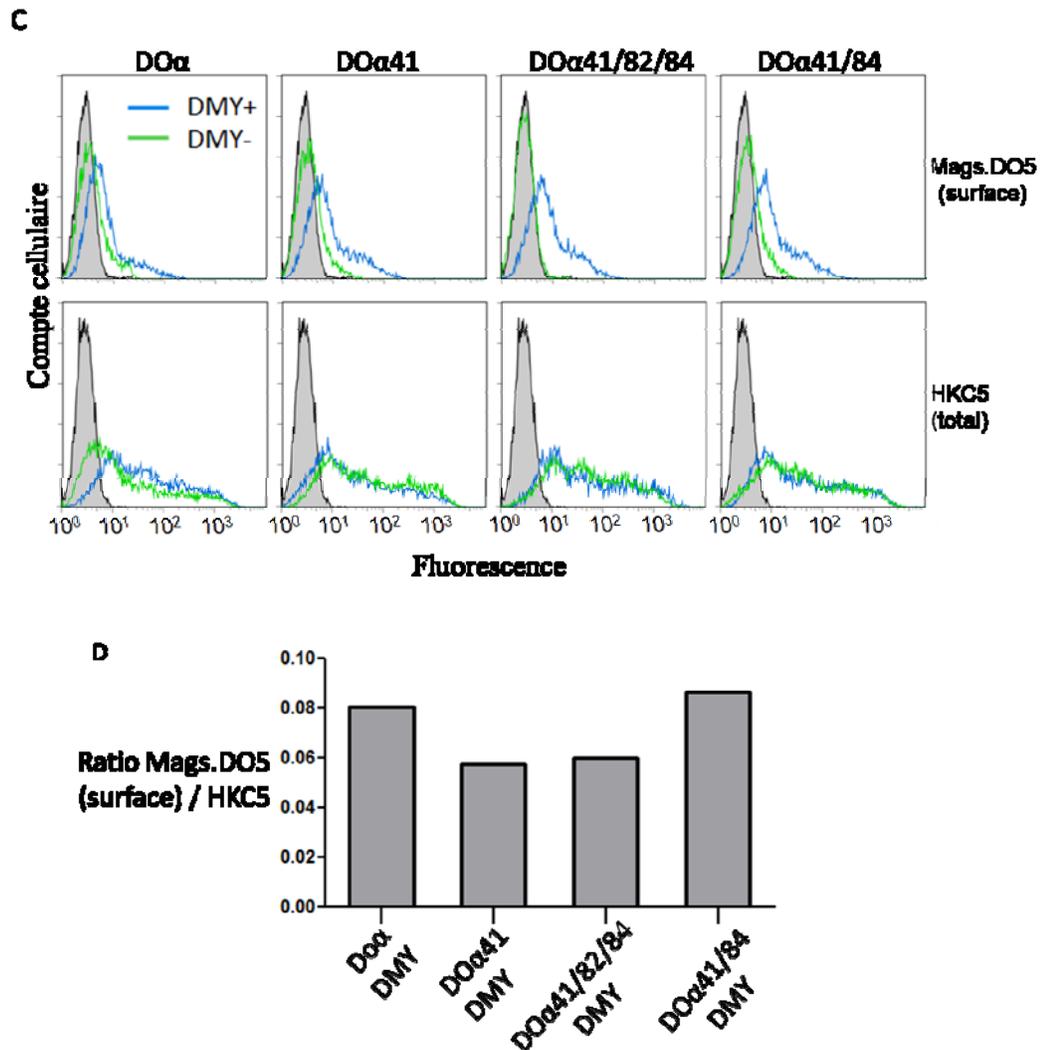
Tel que mentionné à la section 3.2, le mutant DO $\alpha$ PV14/64/84 semble avoir perdu sa capacité de liaison à DM, contrairement au mutant DO $\alpha$ PV14/64/54 (**Figure 3.4**). L'isoleucine à la position 84 de DO $\alpha$  pourrait donc jouer un rôle dans la liaison à DM, son remplacement par la valine réduisant ainsi le contact entre les deux molécules. Ce rôle pourrait être plus visible lorsque la mutation est induite

conjointement à celle des acides aminés des positions 14 ou 64. Suite aux travaux déjà effectués au laboratoire, un rôle de la région 80 à 84 de DO $\alpha$  fut pressenti dans la liaison DO-DM, bien que moins caractérisé que l'acide aminé  $\alpha$ E41(111). Pour mettre en lumière le rôle de l'isoleucine 84, nous avons isolé la mutation R84V, créant et clonant dans pBud DO $\beta$  un mutant DO $\alpha$ R84V (DO $\alpha$ 84), ainsi qu'un mutant DO $\alpha$  R82A/I84T (DO $\alpha$ 82/84); ce dernier mutant reprend les acides aminés de DQ en positions 82 et 84. Des cellules 293T ont ensuite été transfectées avec DO, DO $\alpha$ 82/84 ou DO $\alpha$ 84, en plus de DMY. Les cellules ont été marquées avec Mags.DO5 ou furent perméabilisées à la saponine et marquées avec HKC5. Elles furent analysées par cytométrie en flux. Les deux mutants n'ont pas montré de diminution de liaison à DMY en comparaison avec DO (**figure 3.8 A et B**) : en présence de DMY, leur expression de surface n'est pas moindre que celle de DO. Il conviendrait de répéter plusieurs fois l'expérience dans le but de s'assurer que les résultats sont reproductibles.

Pour explorer la possibilité que l'importance des acides aminés R82 et I84 de DO $\alpha$  dans la liaison DO-DM soit moindre et devienne plus visible en présence d'un autre acide aminé important, nous avons ajouté ces mutations à la mutation E41K, qui réduit la liaison DO-DM (111). Les mutants DO $\alpha$ 41/82/84 et DO $\alpha$ 41/84 ont été construits et clonés dans pBud DO $\beta$ . L'expression de ces mutants a été comparée à celles de DO et de DO $\alpha$ E41K. Les plasmides ont été transfectés dans des cellules 293T, en présence ou non de DMY. Les cellules ont été marquées en surface avec Mags.DO5 ou perméabilisées à la saponine et marquées avec HKC5. L'analyse en cytométrie en flux a montré que l'expression de surface n'a pas été diminuée par la présence des mutations 41/82/84 ou 41/84, par rapport à celle de DO41, et même à celle de DO (**Figure 3.8 C et D**). Curieusement, le contrôle DO41 a montré une expression similaire au contrôle DO. Afin de nous assurer de la reproductibilité des résultats, il serait utile de répéter l'expérience plusieurs fois. Néanmoins, les mutations introduites sur DO $\alpha$  ne semblent pas avoir perturbé la liaison de DO à DMY.

Figure 3,8 A-B

**B**



**Figure 3.8 Les mutations DO $\beta$  R82A/I84T et I84V n'ont pas d'effet majeur sur la liaison DO-DM**

Des cellules 293T transfectées avec pBud DO, pBud DO $\alpha$ 82/84+DO $\beta$  ou pBud DO $\alpha$ 84+ DO $\beta$  (A) ou pBud DO, pBud DO $\alpha$ 41+DO $\beta$ , pBud DO $\alpha$ 41/82/84+DO $\beta$  ou pBud DO $\alpha$ 41/84+DO $\beta$  (C), co-transfectées ou non avec DMY, ont été marquées avec HKC5 (marquage total) ou Mags.DO5 (surface), suivi de l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à Alexa-488. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes pleins représentent le contrôle négatif effectué avec des cellules transfectées avec pBudCE4.1-A. (B), (D) : Ratio des fluorescences Mags.DO5 / HKC5 parmi les transfections DMY+ décrites en (A) et (C), respectivement. Le ratio compare la moyenne de deux essais indépendants en (B) et un seul essai en (D).

CHAPITRE 4  
DISCUSSION

## 4.1 Expression de DO

Pour l'obtention éventuelle de la structure tridimensionnelle de DO, nous avons tenté d'augmenter l'expression de DO par deux moyens : en premier lieu, en augmentant la traduction de DO et, en second lieu, en modifiant sa conformation. La structure tridimensionnelle de DO permettra de clarifier son fonctionnement. Elle pourrait mettre en lumière les raisons pour lesquelles DO ne peut pas lier de peptides. Également, elle pourrait contribuer à définir quels acides aminés pourraient être impliqués dans la liaison à DM.

### 4.1.1 Augmentation de la traduction de DO

Par l'ajout de la séquence partielle de Kozak, nous espérons augmenter la fréquence d'initiation de la traduction et, donc, l'expression de DO (163). Il est à noter que la séquence consensus entière n'a pas été utilisée. La séquence des nucléotides -9 à +4 (GCC) GCCPCCATGG, où P constitue une purine, est conservée (162). Nous avons utilisé (-3 à +3) PCCATG, le P étant ici une adénine. La purine en position -3 est le nucléotide le plus conservé (162). Des expériences évaluant l'effet des mutations sur la synthèse de la propréinsuline abondent en ce sens, l'adénine donnant par ailleurs les meilleurs résultats (164). Quant au G en position +4, nous ne l'avons pas inséré pour ne pas modifier la séquence primaire de DO. Par contre, il est présent naturellement sur DO $\beta$ . Nous avons donc modifié les positions -3 à -1 afin de créer la séquence *acc*. L'expression mesurée par l'anticorps HKC5 montre que la séquence *acc* insérée augmente l'expression de DO $\beta$ , mais elle n'informe pas sur DO $\alpha$ . L'utilisation de Mags.DO5, spécifique à l'hétérodimère DO, peut pallier cette lacune en présence de DM. L'expression de surface mesurée avec Mags.DO semble supérieure pour *acc*-DO en comparaison à DO, bien que l'expérience devrait être répétée de manière à valider cette observation. Il est difficile d'affirmer que l'expression est optimale (par exemple, expression équivalente de DO $\alpha$  et DO $\beta$ ). Malgré tout, la séquence *acc* en positions -1 à -3 a amélioré l'expression de DO $\beta$  et, possiblement, celle de DO.

Bien que non spectaculaire, l'augmentation d'expression significative de DO $\beta$  mesurée avec HKC5 justifie l'utilisation de la séquence *acc* à des buts quantitatifs.

La séquence de DO $\alpha$  a été insérée sous le contrôle du promoteur CMV, et la séquence DO $\beta$  sous le contrôle du promoteur EF-1 $\alpha$  du plasmide pBudCE4.1 (**Figure 2.1**). L'expression des deux ADNc sur un seul plasmide permet de retrouver dans la cellule un nombre égal de copies de ces gènes. Toutefois, le fait que la transcription des gènes insérés ne soit pas sous le contrôle du même promoteur ne garantit pas une expression égale des DO $\alpha$  et DO $\beta$ . Il conviendrait de tenter de régulariser l'expression des deux séquences. Un vecteur d'expression bicistronique contenant le internal ribosome entry site (IRES) a souvent été utilisé pour produire des lignées cellulaires stables de mammifères, majoritairement pour co-exprimer le gène d'intérêt et un agent de sélection, mais il peut également coder pour les deux chaînes d'une même protéine (165-167). Ce système a montré des niveaux intéressants de co-expression. Il conviendrait de vérifier l'expression de DO sous le contrôle d'un IRES et de la comparer à celle de DO sous le contrôle de la séquence partielle de Kozak.

#### 4.1.2 Stabilité de DO

Dans l'optique de la production à grande échelle de DO avec pour but ultime de cristalliser cette protéine, l'amélioration observée de l'expression de DO dans pBudCE4-A par la séquence partielle de Kozak, bien qu'utile, reste d'une importance mitigée. L'amélioration de la conformation de DO constitue la clé, puisque DO, ne pouvant s'extirper seul du RE, est donc mal replié et est dégradé dans le RE. Nous avons d'ailleurs constaté que DM augmente la quantité totale de DO exprimé par la cellule. Ceci renforce l'idée voulant que DO soit rapidement dégradé dans le RE. Le groupe de Karlsson a déjà montré que H2-O semblait présent en moins grande quantité en absence de DM (103). Par ailleurs, la dégradation apparente de DO dans le RE, conjuguée au fait que le RE possède un système de dégradation des protéines mal repliées (168), consolide l'hypothèse

selon laquelle la conformation de DO est responsable de sa rétention au RE.

#### 4.1.3 Modification de la conformation de DO

Remédier au manque de stabilité de DO et induire sa sortie du RE s'avérera essentiel à la production de DO à grande échelle. Or, le mutant DO $\alpha$ P11V, en présence de DO $\beta$ , peut sortir du RE sans l'aide de DM et est détecté à la surface cellulaire (111). Cette mutation fut effectuée en raison de la présence en position 10 d'un acide aminé supplémentaire chez DO et DQ, une glycine, qui cause un renflement des feuillettes N-terminaux. Chez DO, la proline  $\alpha$ 11 pourrait perturber la conformation des feuillettes  $\beta$  N-terminaux, notamment parce qu'elle ne forme pas de ponts hydrogènes; DQ possède une valine, qui ne devrait pas apporter de telles perturbations. Ainsi, la mutation de la proline en valine semble corriger la conformation de DO. La mutation P11V sur le plancher de la niche peptidique non fonctionnelle de la chaîne DO $\alpha$  entraînerait une stabilisation de DO via les feuillettes  $\beta$  (111). Ceci dit, la mutation P11V n'a pas suffi à surpasser les problèmes de production insuffisante de DO en cellules d'insecte (Daved Fremont, communication personnelle). Nous avons donc tenté de corriger par d'autres moyens la conformation de DO.

Les ponts disulfures jouent un rôle primordial dans la conformation des protéines, comme cela fut démontré pour les molécules de classe I du CMH (152). Du côté des CMH-II, DM $\alpha$  possède un pont disulfure non retrouvé chez DO $\alpha$ ; il en va de même pour DM $\beta$  par rapport à DO $\beta$ . Aussi, DR possède le même profil de ponts disulfures que DO. Par ailleurs, van Lith et Benham ont démontré que le pont disulfure C25-C35 unique à DM $\beta$  est nécessaire pour la sortie de DM du RE et l'oxydation de DM $\alpha$  (155). Le pont C25-35 libère DM de sa dépendance à la liaison d'une autre molécule pour adopter une conformation stable. Il est par le fait même envisageable que DO nécessiterait des ponts disulfures additionnels pour consolider sa conformation et, de surcroît, sortir du RE indépendamment des liaisons normalement nécessaires. Donc, pour compenser sa conformation, DO

doit lier DM au même titre que DR doit lier Ii ou un peptide pour corriger la sienne. Nous avons donc tenté d'introduire dans DO des cystéines qui pourraient former des ponts disulfures, combinant aussi ces mutations à la mutation P11V, avec pour but d'améliorer la stabilité et l'expression de DO. Nous avons utilisé la détection de DO à la surface cellulaire pour évaluer s'il pouvait sortir du RE.

L'introduction de cystéines en  $\alpha 14$  et  $\alpha 64$  (mutants DO $\alpha$ PV14/64/54 et 14/64/84) n'a pas corrigé la conformation de DO, car les mutants obtenus ne sont pas exprimés en surface. Il est possible que la mutation additionnelle à la position 84 ait affecté la conformation de DO $\alpha$ PV14/64/84, puisqu'une mutation du segment 80 à 84 abolit l'expression de surface de DOPV (111). Par ailleurs, le fait que DMY n'ait pas augmenté l'expression de surface du mutant DO $\alpha$ PV14/64/84 pourrait traduire le fait que le résidu 84 pourrait être impliqué dans la liaison DO-DM. La mutation en 14/64/54 semble également avoir nui à la conformation de DO, mais de manière moins spectaculaire. Il est à noter que bien que l'introduction de cystéines visait les acides aminés 14 et 64, la mutation introduite involontairement par la *Taq polymérase* en position  $\alpha 54$  du mutant DO $\alpha$ PV14/64/54 est également une cystéine. Cette cystéine pourrait affecter la conformation de DO en créant un pont disulfure aberrant avec une autre cystéine libre sur la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$ .

L'introduction de cystéines sur DO $\beta$  n'a pas non plus suffi à corriger la conformation de DO. Les cystéines introduites sur DO $\beta$  ont réduit à nulle l'expression mesurée par l'anticorps conformationnel Mags.DO5, même en présence de DMY. Il est possible que l'épitope conformationnel reconnu par Mags.DO5 ait été perdu en raison d'un changement de conformation, ou encore que les mutations aient aboli la capacité de DO à lier DM. Un traitement EndoH a démontré que le mutant DO $\beta$ 30/37 ne lie pas DMY. Le fait qu'on retrouve en surface, en absence de DMY, une mince expression de DO, mais aucune expression des DO mutés, supporte l'idée que ces mutants ont une conformation

qui ne peut plus être reconnue par Mags.DO5. Que des ponts disulfures aient été formés ou non, les cystéines introduites ont nui à la conformation de DO. La correction de la conformation de DO par DM augmente la reconnaissance de DO par Mags.DO5 (160). Nos mutants, s'ils avaient corrigé la conformation de DO, auraient fait de même. Or, ils semblent induire l'effet contraire.

Sachant que pour DM, le pont C25-C35 de la chaîne  $\beta$  est nécessaire à l'oxydation de la chaîne  $\alpha$  (155), il est possible que l'introduction de ponts disulfures conjointement sur les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  soit nécessaire pour corriger la conformation de DO. L'introduction de cystéines pourrait aussi résulter en la formation de ponts disulfures  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  ou inter-chaîne. Pour vérifier la formation de ponts disulfures, il conviendrait de comparer en immunobuvardage de type Western la migration des mutants cystéines à celle de la molécule DO de type sauvage. En effet, un repliement induit par un pont disulfure modifiera la vitesse de migration de la glycoprotéine en gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE). Enfin, une modélisation de DO a identifié les résidus 12/64, 12/67 et 14/67 de la chaîne  $\alpha$  comme pouvant également être favorables à la formation de ponts disulfures. Ces mutants pourraient être générés ultérieurement.

L'introduction de cystéines sur DO visant à reproduire les ponts disulfures de DM s'avère une mesure aux moyens imprécis et imprévisibles. Par exemple, le pont disulfure du domaine  $\alpha 1$  de  $DM\alpha$  lie une cystéine du feuillet  $\beta$  de la niche peptidique non fonctionnelle à une cystéine de l'hélice  $\alpha$  bordant la niche peptidique. Or, l'hélice  $\alpha$  de  $DQ\alpha$  possède un pas supplémentaire à celle de  $DM\alpha$  (**figure 3.3**), ce qui pourrait modifier l'effet d'un pont disulfure. De plus, les modèles sont basés sur la grande similarité de séquence entre DO et DQ, mais rien ne garantit que la conformation de DO soit compatible à celle de DQ. Une différence mineure de conformation pourrait invalider le modèle. L'orientation inconnue des feuillets  $\beta$  N-terminaux et des acides aminés des hélices  $\alpha$  rend difficile de prévoir si un pont disulfure est envisageable.

D'autres avenues pourraient être envisagées pour augmenter la stabilité de DO et induire sa sortie autonome du RE. L'utilisation de la mutagenèse aléatoire pour corriger la conformation de DO est envisageable. L'expression de surface de DO pourrait être testée sur les mutants. Toutefois, il est pratiquement impossible par cette méthode d'obtenir un pont disulfure qui corrigerait la conformation de DO, car cela impliquerait l'obtention aléatoire de deux cystéines à des endroits favorables. Par contre, la mutagenèse aléatoire pourrait permettre d'identifier des résidus dont la substitution serait bénéfique pour la conformation de DO. Ces résidus pourraient entre autres être situés dans la région N-terminale, mais aussi dans la région transmembranaire; en effet, des mutations d'acides aminés de régions transmembranaires de molécules de CMH-II ont diminué la reconnaissance de ces molécules par des anticorps conformationnels, en plus de provoquer leur rétention dans le RE (169). La mutagenèse aléatoire sur DO pourrait aussi identifier des résidus non suspectés qui seraient importants dans l'assemblage du dimère  $\alpha\beta$  et sa conformation finale. De plus, la niche peptidique de DR forme deux sites de contact avec les domaines  $\alpha 2$  et  $\beta 2$ , impliquant plusieurs résidus (31). Si tel est le cas pour DO, on peut donc facilement imaginer qu'une légère modification dans la conformation de la niche peptidique pourrait se répercuter sur les domaines proximaux à la membrane. Ainsi, les résidus de DO pouvant être impliqués dans cette interaction pourraient être impliqués dans la mauvaise conformation de DO, et dans la correction subséquente induite par DM. Il conviendrait d'identifier et muter ces résidus pour vérifier leur importance dans la conformation de DO.

Aussi, il a récemment été démontré que des molécules dérivées de l'adamantane pouvaient stabiliser DR en absence de peptide dans la niche peptidique (170). En occupant la pochette P1, le groupement maintient la conformation de DR en un état réceptif aux peptides. Ceci pourrait rappeler le rôle de la chaîne invariante. Puisque DO et DR nécessitent tous deux une liaison (à DM et à Ii ou un peptide, respectivement) pour adopter une conformation

optimale, il serait intéressant de tester l'effet de molécules dérivées de l'adamante sur la conformation de DO. La position  $\beta 86$ , qui constitue le plancher de P1, est importante dans l'effet des composés adamantyl. Les différents allèles de DR portent une glycine ou une valine en  $\beta 86$ , et les effets des composés adamantyl sont uniquement visibles chez les allèles possédant la glycine  $\beta 86$ . Or, l'acide aminé  $\beta 86$  de DO est une glycine. De plus, comme nous l'avons déjà mentionné, les séquences de DO et DR montrent une similarité intéressante. De plus, la présence d'une tyrosine en  $\beta 86$  induit la stabilité de DR en absence de peptide (171). Il serait intéressant de vérifier l'utilisation de composés adamantyl sur la stabilité de DO. La mutation  $\beta G86Y$  a été testée sur DO (Jean-Simon Fortin, communication personnelle). Elle a amélioré l'expression de surface de DO, d'une ampleur toutefois moindre que la mutation  $\alpha P11V$ . Il serait intéressant de vérifier l'effet combiné de ces mutations. Puisque DO ne lie pas de peptides, il est difficile de prévoir si l'effet de DM sur la stabilité de DO peut être imité par l'occupation de P1. La caractérisation de l'interface de liaison DO-DM pourrait aider à mieux construire un modèle de correction de la conformation de DO.

#### **4.2 État d'oxydation de DO**

L'importance des ponts disulfures dans la stabilité de DO reste à déterminer. Le repliement oxydatif induit par les ponts disulfures modifie la vitesse de migration des glycoprotéines en conditions non réductrices en SDS-PAGE. Ainsi, sur la molécule DM, la chaîne  $\alpha$ , qui possède deux ponts disulfures possibles, montre trois états d'oxydation en conditions non réductrices (155); l'une des ces bandes découle d'une molécule entièrement réduite et il est possible que, pour les deux autres bandes, l'une correspond à la glycoprotéine entièrement oxydée et l'autre correspond à la présence d'un seul pont disulfure. Par contre,  $DM\beta$ , malgré la présence de 3 ponts disulfures, montre seulement deux niveaux d'oxydation, l'un correspondant à la conformation réduite.

Nous avons voulu étudier le niveau d'oxydation de DO $\alpha$  et DO $\beta$ . En conditions non-réductrices, la présence concomitante de DO $\alpha$  et DO $\beta$  a résulté en deux états d'oxydation pour DO $\alpha$  et un pour DO $\beta$  (**figure 3.7**). Dans chaque cas, une des bandes correspond à celle obtenue en conditions réductrices, exempte de pont disulfure. La seconde bande obtenue avec DO $\alpha$  correspond à une forme oxydée de la molécule. Nous présumons que l'oxydation de DO $\alpha$  correspond à la formation du pont disulfure C108/C164, le seul qu'elle peut potentiellement former.

Puisque DO $\beta$  possède en théorie deux ponts disulfures, C15-C79 et C117-C173, on pourrait s'attendre à plus d'un niveau d'oxydation. Il est par-dessus tout surprenant de constater que la présence de DM ne semble pas induire l'oxydation de DO $\beta$ . Puisque DM corrige la conformation de DO, nous avons prévu que l'ajout de DM soit nécessaire à la formation d'au moins un des deux ponts disulfures. Pourtant, nous n'avons retrouvé qu'une bande, correspondant à la conformation réduite. Pourtant, le modèle proposé serait intéressant. En effet, l'absence d'un pont disulfure peut nuire à la conformation d'une molécule du CMH-II. Par exemple, une lignée cellulaire présentant une mutation de la cystéine 79 en tyrosine sur DM $\beta$  a favorisé la formation de dimères DM $\alpha\beta$  unis par un pont disulfure plutôt qu'une liaison non-covalente. La mutation a entraîné la rétention du DM $\alpha\beta$  dans le RE, en plus d'une dégradation accélérée (154), témoignant du mauvais repliement de la protéine. On retrouve également des homodimères DM $\beta\beta$ . Chez DM, la cystéine  $\beta$ 79 forme un pont disulfure probable avec la cystéine  $\beta$ 11 dont on retrouve l'équivalent chez DO $\beta$ . L'instabilité engendrée par la mutation en DM $\beta$ 79 rappelle celle trouvée chez DO $\beta$ . Il se pourrait donc que chez DO, un ou plusieurs ponts disulfures ne soient pas formés et que la liaison à DM corrige la situation. Une formation de ponts disulfures entre DO $\alpha$  et DO $\beta$  aurait pu expliquer l'instabilité de DO. Toutefois, puisque DO $\alpha$  et DO $\beta$  se présentent sous forme de monomères en conditions non-réductrices (103), le pont disulfure inter-chaîne ne semble pas présent.

Enfin, il serait intéressant d'étudier le niveau d'oxydation du mutant DOP11V. En effet, il est envisageable que la correction des appariements des feuillettes beta par la mutation P11V se traduise par la formation des ponts disulfures potentiels qui, autrement, ne seraient pas formés. Nous pourrions également étudier le niveau d'oxydation de DO $\alpha$  et DO $\beta$  exprimées séparément, en absence ou en présence de DM; cela pourra indiquer si le niveau d'oxydation de DO $\alpha$  dépend de la présence de DO $\beta$ , et vice-versa.

Il est à noter que la sortie du RE induite par DM permet la maturation des oligosaccharides de DO $\alpha$  et DO $\beta$ , alors que les oligosaccharides de DO, lorsqu'exprimée seule, ne pourront devenir complètement matures. Cette différence aurait pu modifier les résultats des expériences effectuées en immunobuvardage de type Western. Toutefois, cette différence s'est avérée négligeable dans notre expérience, puisque la bande correspondant à l'état le plus réduit (r) de DO est apparue à la même hauteur pour DO et DO + DM, tant pour DO $\alpha$  que DO $\beta$  (**figure 3.7**).

Aussi, l'importance des oligosaccharides sur le niveau d'oxydation de DO est inconnue. DM $\alpha$  possède le site de glycosylation N15, dont l'abolition affecte l'oxydation de DM $\alpha$  (155); par contre, le dimère peut toujours sortir du RE, quoique cette sortie soit ralentie. Ce site de glycosylation n'est pas trouvé chez DO. Il serait intéressant de tester si l'ajout par mutagenèse dirigée d'un site de N-glycosylation à une position équivalente sur DO mènerait à un changement dans sa conformation.

Il est à noter que l'introduction sur DO d'un pont disulfure additionnel pourrait modifier sa vitesse de migration en SDS-PAGE, en induisant un repliement oxydatif de DO. Ainsi, advenant l'obtention par un nouveau pont cystéine d'un mutant qui serait exprimé en surface (section 4.1), il serait intéressant de comparer sa migration à celle de DO.

### 4.3 Rôle des chaperons dans la rétention de DO dans le RE

Il semble que DO soit retenu dans le RE en raison d'un problème de sa conformation. Cette rétention pourrait être le fait des chaperons. Certains chaperons du RE lient les molécules classiques du CMH de classe II, dont certaines glycoprotéines mal repliées (33;149-151); toutefois leur liaison à DO reste à démontrer. Néanmoins, les chaperons du RE sont retrouvés dans des complexes incluant les enzymes impliqués dans la formation de ponts disulfures (144). De plus, le BiP et la calnexine collaborent à l'acheminement des protéines mal repliées vers le système de dégradation ERAD (145;146). Puisque DO semble mal replié et dégradé dans le RE et qu'il est soumis à la formation de ponts disulfures, les chaperons pourraient visiblement être impliqués dans le processus. Aussi, DM pourrait induire un changement de conformation de DO qui le libérerait des chaperons, ou encore entrer en compétition avec ces derniers pour la liaison de DO. Pour détecter la présence de chaperons associés à DO, il conviendrait d'effectuer des expériences de co-précipitation. Ainsi, dans une lignée cellulaire exprimant DO, il conviendrait d'effectuer une immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre la calnexine, BiP ou GRP94, et d'effectuer un immunobuvardage de type Western avec l'anticorps HKC5.

### 4.4 Interaction DO-DM

Le site d'interaction DO-DM demeure pour l'instant à définir. Fait intéressant, dans le mutant DO $\alpha$ P11V/Y14C/I64C/I84V précédemment décrit, la mutation en position 84 pourrait avoir aboli la liaison à DM. Ceci concorde en partie avec les résultats d'expériences effectuées précédemment au laboratoire montrant que, sur DO $\alpha$ , des résidus situés aux positions 80 à 84 pouvaient exercer un rôle dans la liaison à DM (111). Dans ces expériences, une chimère DR84/DO, où les 84 premiers acides aminés de DO étaient remplacés par ceux de DR, montrait une diminution de la liaison à DM, contrairement à DR77/DO. Par contre, la liaison à DM n'était pas totalement abolie, contrairement à nos résultats.

Il est possible que l'introduction de cystéines dans notre mutant DO $\alpha$ P11V/Y14C/I64C/I84V s'avère néfaste à la conformation de DO. Enfin, il est peu probable que la mutation en position 84 puisse agir en effet cumulatif avec les mutations en positions 14 et 64, car ceux-ci n'ont pas été identifiés comme étant importants pour la liaison à DM.

Pour éclaircir ce point, nous avons introduit la mutation I84V ou R82A/I84T sur DO $\alpha$ . Or, par rapport à DO, DO84 et DO8284 n'ont pas montré de diminution de la liaison à DMY. Ainsi, l'abolition de la liaison à DM du mutant DOPV/14/64/84 était au moins en partie expliquée par un défaut dans la conformation de la protéine mutante. Si I84 est impliqué dans l'interface de la liaison DO-DM, l'effet attribuable à sa mutation est moindre que l'abolition totale de la liaison à DM qui avait été suggérée par le mutant DO $\alpha$ PV14/64/84. Pour vérifier si la position 84 exerce un rôle subtil dans la liaison DO-DM, nous avons combiné les mutations des positions 84 et 82/84 à la mutation E41K qui, elle, est impliquée dans la liaison DO-DM (111). L'utilisation de DO $\alpha$ 41/84 et DO $\alpha$ 41/82/84 n'a pas diminué la liaison de DO à DMY. Ce dernier résultat surprend davantage. Le contrôle DO $\alpha$ E41K a également montré une liaison à DMY étonnante, alors que Deshaies et al. ont démontré que cette même mutation E41K affectait significativement la liaison DO-DM (111). Toutefois, des divergences de méthode pourraient expliquer la différence entre les résultats observés. L'étude de Deshaies et al. mesurait, via l'expression de surface de DO, la liaison DO-DMY par le biais de mutations conjointes  $\alpha$ E41K et  $\alpha$ F52S. La diminution de liaison à DMY pourrait être tributaire de ces deux mutations. Deshaies et al. ont également vérifié l'effet de la mutation  $\alpha$ E41K sur la liaison DO-DM en mesurant l'expression de complexes CMH/CLIP en surface, ce qui diffère de notre méthode. Il conviendrait de vérifier également l'expression des complexes CMH/CLIP en présence de nos mutants. Enfin, il serait souhaitable de revérifier plusieurs fois la capacité de liaison à DM de nos mutants afin de s'assurer que les résultats obtenus sont reproductibles.

Nous n'avons pas caractérisé la région de DM pouvant être impliquée dans la liaison DO-DM. Des études de mutagenèse dirigée ont identifié la région DM $\beta$ 1 comme étant importante dans la liaison DO-DM (172). L'identification des acides aminés de DO et de DM impliqués dans la liaison DO-DM permettra de mieux comprendre l'effet que ces glycoprotéines exercent l'une sur l'autre.

L'obtention éventuelle d'un cristal DO-DM permettra évidemment de mieux caractériser l'interaction entre ces deux molécules. La caractérisation de la liaison DO-DM permettra entre autres de préciser le mécanisme d'inhibition de DO sur DM. On ne peut affirmer pour l'instant avec certitude si DO entre directement en compétition avec DR pour la liaison à DM ou si DO induit un changement de conformation qui rend la liaison DM-DR impossible. Le fait que  $\alpha$ E41, chez DO, et  $\alpha$ E40, chez DM (173), soient tous deux impliqués dans la liaison DO-DM et DR-DM, respectivement, supporte le modèle de compétition. L'obtention d'un cristal DO-DM pourrait permettre d'observer un changement de conformation de DM induit par la liaison à DO. La caractérisation de la liaison DO-DM permettra aussi de mieux comprendre comment le pH influence l'action de DO. On ignore pour le moment si la perte d'activité de DO à pH acide est causée par une dissociation du complexe DO-DM.

CHAPITRE 4  
CONCLUSION

La présentation antigénique par le CMH-II est régulée par HLA-DM et HLA-DO. Les connaissances sur ces deux molécules non-classiques demeurent encore à approfondir, particulièrement en ce qui concerne DO. Son rôle précis est incompris. Jusqu'à tout récemment, nous croyions qu'elle n'était pas exprimée dans les cellules dendritiques. La découverte de cette expression ouvre la porte à des fonctions physiologiques insoupçonnées. On comprendra mieux le rôle de DO lorsque sera mieux caractérisée sa distribution tissulaire. Les rôles possibles de DO dans l'induction de la tolérance, l'auto-immunité, le cancer ou divers aspects du système immunitaire seront mieux compris après avoir approfondi nos connaissances sur la localisation, la structure et le mode d'action de DO.

Le cristal de DO reste toujours à obtenir. DO demeure une molécule instable qui est retenue et dégradée dans le RE. Nous tentons de corriger la conformation de DO de manière à améliorer son expression. Les essais antérieurs ont résulté en une production insuffisante de protéine, malgré l'utilisation de DO $\alpha$ P11V, dont la mutation corrige la conformation de DO de manière à permettre la sortie indépendante du RE. Nous avons tenté de corriger la conformation de DO en introduisant des ponts disulfures similaires à ceux trouvés chez DM. Jusqu'ici, la conformation de DO n'a pas été améliorée. L'utilisation de molécules dérivées de l'adamante, qui stabilisent DR en occupant la pochette P1 de sa niche peptidique, constitue une des avenues à explorer pour stabiliser DO.

L'obtention éventuelle du cristal de DO serait utile à plusieurs égards. La structure de la niche peptidique pourrait permettre de comprendre l'incapacité de DO à lier des peptides. La structure tridimensionnelle de DO permettra également d'identifier des résidus qui pourraient être impliqués dans l'interface d'interaction entre DO et DM. Nous pourrions vérifier l'importance de ces résidus dans la liaison DO-DM en les remplaçant par mutagenèse dirigée. La structure de DO permettra aussi de mieux caractériser les contacts entre les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  et, possiblement, d'expliquer les raisons de la conformation non optimale de DO. La

structure tridimensionnelle renseignera sur la conformation de DO et permettra de vérifier si DO possède un repliement semblable à celui des molécules classiques. Toutefois, la structure tridimensionnelle obtenue sera possiblement celle d'un DO muté, dont la mutation aura servi à améliorer la conformation de la molécule, de manière à augmenter son expression. Ainsi, la conformation observée pourrait différer de la conformation réelle de DO. Néanmoins, l'obtention éventuelle de la structure tridimensionnelle de DO et de celle du complexe DO-DM permettra de comparer la structure de DO en absence et en présence de DM, permettant de décrire les changements apportés à DO par la liaison de DM.

Nous avons également étudié les niveaux d'oxydation de DO. Nous n'avons pas trouvé de modification des ponts disulfures induite par la présence de DM. La conformation de DO semble dépendre des feuilletts beta des domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ , mais aussi d'autres endroits, comme la région transmembranaire. Il est probable que la liaison de DM à DO induise des changements en de nombreux endroits allant de la région  $\alpha 1/\beta 1$  à la région transmembranaire. Il sera par ailleurs intéressant dans le futur de vérifier si l'amélioration de la conformation de DO par les mutations  $\alpha P11V$  ou  $\beta 86Y$  se répercute sur l'oxydation de DO.

La liaison DO-DM, qui semble impliquer majoritairement  $DO\alpha$  et  $DM\beta$ , reste toujours à définir clairement. Nous n'avons pas réussi, dans cette étude, à la définir davantage. La caractérisation de la liaison DO-DM permettra de mieux comprendre le fonctionnement de DO.

La structure tridimensionnelle de DO, sa fonction et la caractérisation de sa liaison à DM sont étroitement liées et l'exploration des ces différentes facettes sera nécessaire pour mieux déterminer le rôle de DO dans la présentation antigénique.

## CHAPITRE 6: BIBLIOGRAPHIE

1. Delves,P.J., and Roitt,I.M. 2000. The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**:108-117.
2. Delves,P.J., and Roitt,I.M. 2000. The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**:37-49.
3. Goldsby,R.A., Kindt,T.J., Osborne B.A., and Kuby J. 2003. Immunology 5th edition (ebook). 188.
4. Janeway,C.A.J., Travers,P., Walport,M., and Shlomchik,M.J. 2001. Immunobiology: the immune system in health and disease (ebook). Garland Publishing, New York. 370.
5. Klein,J., and Sato,A. 2000. The HLA system. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**:702-709.
6. Forbes,S.A., and Trowsdale,J. 1999. The MHC quarterly report. *Immunogenetics* **50**:152-159.
7. Chang,C.H., Fontes,J.D., Peterlin,M., and Flavell,R.A. 1994. Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J. Exp. Med.* **180**:1367-1374.
8. Steimle,V., Otten,L.A., Zufferey,M., and Mach,B. 1993. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* **75**:135-146.
9. Reith,W., Steimle,V., and Mach,B. 1995. Molecular defects in the bare lymphocyte syndrome and regulation of MHC class II genes. *Immunol. Today* **16**:539-546.
10. Zhu,X.S., Linhoff,M.W., Li,G., Chin,K.C., Maity,S.N., and Ting,J.P. 2000. Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol. Cell Biol.* **20**:6051-6061.
11. Brown,J.H., Jardetzky,T.S., Gorga,J.C., Stern,L.J., Urban,R.G., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**:33-39.
12. Brown,J.H., Jardetzky,T.S., Stern,L.J., Gorga,J.C., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. 1995. Human class II MHC molecule HLA-DR1: X-ray structure determined from three crystal forms. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **51**:946-961.

13. Batalia, M.A., and Collins, E.J. 1997. Peptide binding by class I and class II MHC molecules. *Biopolymers* **43**:281-302.
14. Konig, R., Huang, L.Y., and Germain, R.N. 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* **356**:796-798.
15. Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., and Kuby, J. 2003. Immunology 5th edition (ebook). W.H. Freeman & Company. 166.
16. Germain, R.N., and Hendrix, L.R. 1991. MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* **353**:134-139.
17. Dessen, A., Lawrence, C.M., Cupo, S., Zaller, D.M., and Wiley, D.C. 1997. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA\*0101, DRB1\*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*. **7**:473-481.
18. Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., and Wiley, D.C. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* **378**:457-462.
19. Zhu, Y., Rudensky, A.Y., Corper, A.L., Teyton, L., and Wilson, I.A. 2003. Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-Ab peptide-binding motif. *J. Mol. Biol.* **326**:1157-1174.
20. Fremont, D.H., Hendrickson, W.A., Marrack, P., and Kappler, J. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* **272**:1001-1004.
21. Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* **368**:215-221.
22. Scott, C.A., Garcia, K.C., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A., and Teyton, L. 1998. Engineering protein for X-ray crystallography: the murine Major Histocompatibility Complex class II molecule I-Ad. *Protein Sci.* **7**:413-418.
23. Murthy, V.L., and Stern, L.J. 1997. The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding. *Structure*. **5**:1385-1396.
24. Das, H.K., Lawrance, S.K., and Weissman, S.M. 1983. Structure and nucleotide sequence of the heavy chain gene of HLA-DR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**:3543-3547.

25. Rudensky,A.Y., Preston-Hurlburt,P., Hong,S.C., Barlow,A., and Janeway,C.A., Jr. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**:622-627.
26. Chicz,R.M., Urban,R.G., Lane,W.S., Gorga,J.C., Stern,L.J., Vignali,D.A., and Strominger,J.L. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* **358**:764-768.
27. Sette,A., Adorini,L., Colon,S.M., Buus,S., and Grey,H.M. 1989. Capacity of intact proteins to bind to MHC class II molecules. *J. Immunol.* **143**:1265-1267.
28. Arunachalam,B., Pan,M., and Cresswell,P. 1998. Intracellular formation and cell surface expression of a complex of an intact lysosomal protein and MHC class II molecules. *J. Immunol.* **160**:5797-5806.
29. Narayan,K., Chou,C.L., Kim,A., Hartman,I.Z., Dalai,S., Khoruzhenko,S., and Sadegh-Nasseri,S. 2007. HLA-DM targets the hydrogen bond between the histidine at position beta81 and peptide to dissociate HLA-DR-peptide complexes. *Nat. Immunol.* **8**:92-100.
30. Hammer,J., Belunis,C., Bolin,D., Papadopoulos,J., Walsky,R., Higelin,J., Danho,W., Sinigaglia,F., and Nagy,Z.A. 1994. High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**:4456-4460.
31. Murthy,V.L., and Stern,L.J. 1997. The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding. *Structure.* **5**:1385-1396.
32. Smith,K.J., Pyrdol,J., Gauthier,L., Wiley,D.C., and Wucherpfennig,K.W. 1998. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J. Exp. Med.* **188**:1511-1520.
33. Schaiff,W.T., Hruska,K.A., Jr., McCourt,D.W., Green,M., and Schwartz,B.D. 1992. HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *J. Exp. Med.* **176**:657-666.
34. McFarland,B.J., and Beeson,C. 2002. Binding interactions between peptides and proteins of the class II major histocompatibility complex. *Med. Res. Rev.* **22**:168-203.
35. Riberdy,J.M., Newcomb,J.R., Surman,M.J., Barbosa,J.A., and Cresswell,P. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* **360**:474-477.

36. Roche,P.A., and Cresswell,P. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345**:615-618.
37. Elliott,E.A., Drake,J.R., Amigorena,S., Elsemore,J., Webster,P., Mellman,I., and Flavell,R.A. 1994. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* **179**:681-694.
38. Long,E.O., LaVaute,T., Pinet,V., and Jaraquemada,D. 1994. Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J. Immunol.* **153**:1487-1494.
39. Stumptner-Cuvelette,P., and Benaroch,P. 2002. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim. Biophys. Acta* **1542**:1-13.
40. Strubin,M., Berte,C., and Mach,B. 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* **5**:3483-3488.
41. Chang,C.H., and Flavell,R.A. 1995. Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J. Exp. Med.* **181**:765-767.
42. Matza,D., Wolstein,O., Dikstein,R., and Shachar,I. 2001. Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAF(II)105-NF-kappaB-dependent transcription program. *J. Biol. Chem.* **276**:27203-27206.
43. Roche,P.A., Marks,M.S., and Cresswell,P. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* **354**:392-394.
44. Odorizzi,C.G., Trowbridge,I.S., Xue,L., Hopkins,C.R., Davis,C.D., and Collawn,J.F. 1994. Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J. Cell Biol.* **126**:317-330.
45. Pond,L., Kuhn,L.A., Teyton,L., Schutze,M.P., Tainer,J.A., Jackson,M.R., and Peterson,P.A. 1995. A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **270**:19989-19997.
46. Pieters,J., Bakke,O., and Dobberstein,B. 1993. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell Sci.* **106 ( Pt 3)**:831-846.
47. Roche,P.A., Teletski,C.L., Stang,E., Bakke,O., and Long,E.O. 1993. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:8581-8585.

48. Benaroch,P., Yilla,M., Raposo,G., Ito,K., Miwa,K., Geuze,H.J., and Ploegh,H.L. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* **14**:37-49.
49. McCormick,P.J., Martina,J.A., and Bonifacino,J.S. 2005. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:7910-7915.
50. Wang,K., Peterson,P.A., and Karlsson,L. 1997. Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J. Biol. Chem.* **272**:17055-17060.
51. Riese,R.J., and Chapman,H.A. 2000. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:107-113.
52. Riese,R.J., Wolf,P.R., Bromme,D., Natkin,L.R., Villadangos,J.A., Ploegh,H.L., and Chapman,H.A. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity.* **4**:357-366.
53. Denzin,L.K., and Cresswell,P. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* **82**:155-165.
54. Sloan,V.S., Cameron,P., Porter,G., Gammon,M., Amaya,M., Mellins,E., and Zaller,D.M. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* **375**:802-806.
55. Germain,R.N., and Rinker,A.G., Jr. 1993. Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules. *Nature* **363**:725-728.
56. Wubbolts,R., Fernandez-Borja,M., Jordens,I., Reits,E., Dusseljee,S., Echeverri,C., Vallee,R.B., and Neefjes,J. 1999. Opposing motor activities of dynein and kinesin determine retention and transport of MHC class II-containing compartments. *J. Cell Sci.* **112 ( Pt 6)**:785-795.
57. Wubbolts,R., Fernandez-Borja,M., Oomen,L., Verwoerd,D., Janssen,H., Calafat,J., Tulp,A., Dusseljee,S., and Neefjes,J. 1996. Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J. Cell Biol.* **135**:611-622.
58. Raposo,G., Nijman,H.W., Stoorvogel,W., Liejendekker,R., Harding,C.V., Melief,C.J., and Geuze,H.J. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**:1161-1172.
59. Kleijmeer,M., Ramm,G., Schuurhuis,D., Griffith,J., Rescigno,M., Ricciardi-Castagnoli,P., Rudensky,A.Y., Ossendorp,F., Melief,C.J., Stoorvogel,W. et al 2001.

Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell Biol.* **155**:53-63.

60. Vyas,J.M., Kim,Y.M., rtavanis-Tsakonas,K., Love,J.C., Van,d., V, and Ploegh,H.L. 2007. Tubulation of class II MHC compartments is microtubule dependent and involves multiple endolysosomal membrane proteins in primary dendritic cells. *J. Immunol.* **178**:7199-7210.
61. Watts,C. 2004. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat. Immunol.* **5**:685-692.
62. Maric,M., Arunachalam,B., Phan,U.T., Dong,C., Garrett,W.S., Cannon,K.S., Alfonso,C., Karlsson,L., Flavell,R.A., and Cresswell,P. 2001. Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science* **294**:1361-1365.
63. Watts,C. 2001. Immunology. Antigen presentation--losing its shine in the absence of GILT. *Science* **294**:1294-1295.
64. Jensen,P.E. 1995. Antigen unfolding and disulfide reduction in antigen presenting cells. *Semin. Immunol.* **7**:347-353.
65. Robinson,J.H., and Delvig,A.A. 2002. Diversity in MHC class II antigen presentation. *Immunology* **105**:252-262.
66. Trombetta,E.S., Ebersold,M., Garrett,W., Pypaert,M., and Mellman,I. 2003. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* **299**:1400-1403.
67. Geuze,H.J. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* **19**:282-287.
68. West,M.A., Lucocq,J.M., and Watts,C. 1994. Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* **369**:147-151.
69. Tulp,A., Verwoerd,D., Dobberstein,B., Ploegh,H.L., and Pieters,J. 1994. Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* **369**:120-126.
70. Peters,P.J., Neefjes,J.J., Oorschot,V., Ploegh,H.L., and Geuze,H.J. 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* **349**:669-676.
71. Ferrari,G., Knight,A.M., Watts,C., and Pieters,J. 1997. Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *J. Cell Biol.* **139**:1433-1446.

72. Pierre,P., Denzin,L.K., Hammond,C., Drake,J.R., Amigorena,S., Cresswell,P., and Mellman,I. 1996. HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments. *Immunity*. **4**:229-239.
73. Neefjes,J. 1999. CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur. J. Immunol.* **29**:1421-1425.
74. Sanderson,F., Powis,S.H., Kelly,A.P., and Trowsdale,J. 1994. Limited polymorphism in HLA-DM does not involve the peptide binding groove. *Immunogenetics* **39**:56-58.
75. Kropshofer,H., Hammerling,G.J., and Vogt,A.B. 1999. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol. Rev.* **172**:267-278.
76. Sanderson,F., Kleijmeer,M.J., Kelly,A., Verwoerd,D., Tulp,A., Neefjes,J.J., Geuze,H.J., and Trowsdale,J. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* **266**:1566-1569.
77. Denzin,L.K., Fallas,J.L., Prendes,M., and Yi,W. 2005. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunol. Rev.* **207**:279-292.
78. Denzin,L.K., Robbins,N.F., Carboy-Newcomb,C., and Cresswell,P. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity*. **1**:595-606.
79. Alfonso,C., and Karlsson,L. 2000. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:113-142.
80. Chen,X., Laur,O., Kambayashi,T., Li,S., Bray,R.A., Weber,D.A., Karlsson,L., and Jensen,P.E. 2002. Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J. Exp. Med.* **195**:1053-1062.
81. Kropshofer,H., Vogt,A.B., Thery,C., Armandola,E.A., Li,B.C., Moldenhauer,G., Amigorena,S., and Hammerling,G.J. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *EMBO J.* **17**:2971-2981.
82. Marks,M.S., Roche,P.A., van,D.E., Woodruff,L., Peters,P.J., and Bonifacino,J.S. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.* **131**:351-369.
83. Lindstedt,R., Liljedahl,M., Peleraux,A., Peterson,P.A., and Karlsson,L. 1995. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity*. **3**:561-572.

84. Min, Y.H., Lee, S.T., Choi, K.M., Hahn, J.S., and Ko, Y.W. 2000. Surface expression of HLA-DM on dendritic cells derived from CD34-positive bone marrow haematopoietic stem cells. *Br. J. Haematol.* **110**:385-393.
85. Arndt, S.O., Vogt, A.B., Markovic-Plese, S., Martin, R., Moldenhauer, G., Wolpl, A., Sun, Y., Schadendorf, D., Hammerling, G.J., and Kropshofer, H. 2000. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J.* **19**:1241-1251.
86. Santambrogio, L., Sato, A.K., Carven, G.J., Belyanskaya, S.L., Strominger, J.L., and Stern, L.J. 1999. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:15056-15061.
87. Santambrogio, L., Sato, A.K., Fischer, F.R., Dorf, M.E., and Stern, L.J. 1999. Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:15050-15055.
88. Andersson, T., Patwardhan, A., Emilson, A., Carlsson, K., and Scheynius, A. 1998. HLA-DM is expressed on the cell surface and colocalizes with HLA-DR and invariant chain in human Langerhans cells. *Arch. Dermatol. Res.* **290**:674-680.
89. Mosyak, L., Zaller, D.M., and Wiley, D.C. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity.* **9**:377-383.
90. Fremont, D.H., Crawford, F., Marrack, P., Hendrickson, W.A., and Kappler, J. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity.* **9**:385-393.
91. Nicholson, M.J., Moradi, B., Seth, N.P., Xing, X., Cuny, G.D., Stein, R.L., and Wucherpfennig, K.W. 2006. Small molecules that enhance the catalytic efficiency of HLA-DM. *J. Immunol.* **176**:4208-4220.
92. Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J.S., and Hammerling, G.J. 1996. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* **15**:6144-6154.
93. Martin, W.D., Hicks, G.G., Mendiratta, S.K., Leva, H.I., Ruley, H.E., and Van, K.L. 1996. H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* **84**:543-550.
94. Brocke, P., Garbi, N., Momburg, F., and Hammerling, G.J. 2002. HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:22-29.
95. Ferrante, A., Anderson, M.W., Klug, C.S., and Gorski, J. 2008. HLA-DM mediates epitope selection by a "compare-exchange" mechanism when a potential peptide pool is available. *PLoS. ONE.* **3**:e3722.

96. Denzin,L.K., Hammond,C., and Cresswell,P. 1996. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J. Exp. Med.* **184**:2153-2165.
97. Davies,M.N., Lamikanra,A., Sansom,C.E., Flower,D.R., Moss,D.S., and Travers,P.J. 2008. Identification of the HLA-DM/HLA-DR interface. *Mol. Immunol.* **45**:1063-1070.
98. Karlsson,L., Surh,C.D., Sprent,J., and Peterson,P.A. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* **351**:485-488.
99. Tonnelles,C., DeMars,R., and Long,E.O. 1985. DO beta: a new beta chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J.* **4**:2839-2847.
100. Servenius,B., Rask,L., and Peterson,P.A. 1987. Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO beta gene is a divergent member of the class II beta gene family. *J. Biol. Chem.* **262**:8759-8766.
101. Thibodeau,J., Lavoie,P.M., Samaan,A., Corre,J.P., Sekaly,R.P., and Cazenave,P.A. 1998. Conserved structural features between HLA-DO beta and -DR beta. *Mol. Immunol.* **35**:885-893.
102. Trowsdale,J., and Kelly,A. 1985. The human HLA class II alpha chain gene DZ alpha is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO J.* **4**:2231-2237.
103. Liljedahl,M., Kuwana,T., Fung-Leung,W.P., Jackson,M.R., Peterson,P.A., and Karlsson,L. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J.* **15**:4817-4824.
104. Inoko,H., Ando,A., Kimura,M., and Tsuji,K. 1985. Isolation and characterization of the cDNA clone and genomic clones of a new HLA class II antigen heavy chain, DO alpha. *J. Immunol.* **135**:2156-2159.
105. Karlsson,L., and Peterson,P.A. 1992. The alpha chain gene of H-2O has an unexpected location in the major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* **176**:477-483.
106. Kelly,A.P., Monaco,J.J., Cho,S.G., and Trowsdale,J. 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* **353**:571-573.
107. Fremont,D.H., Stura,E.A., Matsumura,M., Peterson,P.A., and Wilson,I.A. 1995. Crystal structure of an H-2Kb-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:2479-2483.
108. Gauthier,L., Smith,K.J., Pyrdol,J., Kalandadze,A., Strominger,J.L., Wiley,D.C., and Wucherpfennig,K.W. 1998. Expression and crystallization of the complex of HLA-

- DR2 (DRA, DRB1\*1501) and an immunodominant peptide of human myelin basic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:11828-11833.
109. Saito, Y., Peterson, P.A., and Matsumura, M. 1993. Quantitation of peptide anchor residue contributions to class I major histocompatibility complex molecule binding. *J. Biol. Chem.* **268**:21309-21317.
  110. Teasdale, R.D., and Jackson, M.R. 1996. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**:27-54.
  111. Deshaies, F., Brunet, A., Diallo, D.A., Denzin, L.K., Samaan, A., and Thibodeau, J. 2005. A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:6443-6448.
  112. Hornell, T.M., Burster, T., Jahnsen, F.L., Pashine, A., Ochoa, M.T., Harding, J.J., Macaubas, C., Lee, A.W., Modlin, R.L., and Mellins, E.D. 2006. Human dendritic cell expression of HLA-DO is subset specific and regulated by maturation. *J. Immunol.* **176**:3536-3547.
  113. Chen, X., Reed-Loisel, L.M., Karlsson, L., and Jensen, P.E. 2006. H2-O expression in primary dendritic cells. *J. Immunol.* **176**:3548-3556.
  114. Douek, D.C., and Altmann, D.M. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int. Immunol.* **9**:355-364.
  115. Fallas, J.L., Yi, W., Draghi, N.A., O'Rourke, H.M., and Denzin, L.K. 2007. Expression patterns of H2-O in mouse B cells and dendritic cells correlate with cell function. *J. Immunol.* **178**:1488-1497.
  116. Glazier, K.S., Hake, S.B., Tobin, H.M., Chadburn, A., Schattner, E.J., and Denzin, L.K. 2002. Germinal center B cells regulate their capability to present antigen by modulation of HLA-DO. *J. Exp. Med.* **195**:1063-1069.
  117. Hornell, T.M., Burster, T., Jahnsen, F.L., Pashine, A., Ochoa, M.T., Harding, J.J., Macaubas, C., Lee, A.W., Modlin, R.L., and Mellins, E.D. 2006. Human dendritic cell expression of HLA-DO is subset specific and regulated by maturation. *J. Immunol.* **176**:3536-3547.
  118. Taxman, D.J., Cressman, D.E., and Ting, J.P. 2000. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *J. Immunol.* **165**:1410-1416.

119. Nagarajan,U.M., Lochamy,J., Chen,X., Beresford,G.W., Nilsen,R., Jensen,P.E., and Boss,J.M. 2002. Class II transactivator is required for maximal expression of HLA-DOB in B cells. *J. Immunol.* **168**:1780-1786.
120. Khalil,H., Deshaies,F., Bellemare-Pelletier,A., Brunet,A., Faubert,A., Azar,G.A., and Thibodeau,J. 2002. Class II transactivator-induced expression of HLA-DO(beta) in HeLa cells. *Tissue Antigens* **60**:372-382.
121. Hake,S.B., Tobin,H.M., Steimle,V., and Denzin,L.K. 2003. Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes. *Eur. J. Immunol.* **33**:2361-2371.
122. Brunet,A., Samaan,A., Deshaies,F., Kindt,T.J., and Thibodeau,J. 2000. Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta. *J. Biol. Chem.* **275**:37062-37071.
123. van,L.M., van,H.M., Griekspoor,A., Tjin,E., Verwoerd,D., Calafat,J., Janssen,H., Reits,E., Pastoors,L., and Neefjes,J. 2001. Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J. Immunol.* **167**:884-892.
124. van,L.M., van,H.M., and Neefjes,J. 2003. Stable expression of MHC class I heavy chain/HLA-DO complexes at the plasma membrane. *Eur. J. Immunol.* **33**:1145-1151.
125. Sant,A.J., Hendrix,L.R., Coligan,J.E., Maloy,W.L., and Germain,R.N. 1991. Defective intracellular transport as a common mechanism limiting expression of inappropriately paired class II major histocompatibility complex alpha/beta chains. *J. Exp. Med.* **174**:799-808.
126. Gondre-Lewis,T.A., Moquin,A.E., and Drake,J.R. 2001. Prolonged antigen persistence within nonterminal late endocytic compartments of antigen-specific B lymphocytes. *J. Immunol.* **166**:6657-6664.
127. Sanderson,F., Thomas,C., Neefjes,J., and Trowsdale,J. 1996. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity.* **4**:87-96.
128. Chalouni,C., Banchereau,J., Vogt,A.B., Pascual,V., and Davoust,J. 2003. Human germinal center B cells differ from naive and memory B cells by their aggregated MHC class II-rich compartments lacking HLA-DO. *Int. Immunol.* **15**:457-466.
129. Chen,X., and Jensen,P.E. 2008. The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz. )* **56**:77-83.
130. Pashine,A., Busch,R., Belmares,M.P., Munning,J.N., Doebele,R.C., Buckingham,M., Nolan,G.P., and Mellins,E.D. 2003. Interaction of HLA-DR with an

- acidic face of HLA-DM disrupts sequence-dependent interactions with peptides. *Immunity*. **19**:183-192.
131. Deshaies, F. 2004. Analyse structure-fonction de la molécule non classique du CMH de classe II HLA-DO, thèse de doctorat, Université de Montréal. 127-128.
  132. van, L.M., van, H.M., and Neefjes, J. 2002. Novel polymorphisms in HLA-DOA and HLA-DOB in B-cell malignancies. *Immunogenetics* **54**:591-595.
  133. Denzin, L.K., Sant'Angelo, D.B., Hammond, C., Surman, M.J., and Cresswell, P. 1997. Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* **278**:106-109.
  134. van Ham, S.M., Tjin, E.P., Lillemeier, B.F., Gruneberg, U., van Meijgaarden, K.E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D. et al 1997. HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr. Biol.* **7**:950-957.
  135. van, H.M., van, L.M., Lillemeier, B., Tjin, E., Gruneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van, M.K., Roucard, C., Trowsdale, J. et al 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J. Exp. Med.* **191**:1127-1136.
  136. Liljedahl, M., Winqvist, O., Surh, C.D., Wong, P., Ngo, K., Teyton, L., Peterson, P.A., Brunmark, A., Rudensky, A.Y., Fung-Leung, W.P. et al 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity*. **8**:233-243.
  137. Alfonso, C., Williams, G.S., Han, J.O., Westberg, J.A., Winqvist, O., and Karlsson, L. 2003. Analysis of H2-O influence on antigen presentation by B cells. *J. Immunol.* **171**:2331-2337.
  138. Liljedahl, M., Winqvist, O., Surh, C.D., Wong, P., Ngo, K., Teyton, L., Peterson, P.A., Brunmark, A., Rudensky, A.Y., Fung-Leung, W.P. et al 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity*. **8**:233-243.
  139. Perraudeau, M., Taylor, P.R., Stauss, H.J., Lindstedt, R., Bygrave, A.E., Pappin, D.J., Ellmerich, S., Whitten, A., Rahman, D., Canas, B. et al 2000. Altered major histocompatibility complex class II peptide loading in H2-O-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* **30**:2871-2880.
  140. Jemmerson, R., and Paterson, Y. 1986. Mapping epitopes on a protein antigen by the proteolysis of antigen-antibody complexes. *Science* **232**:1001-1004.
  141. Chen, X., and Jensen, P.E. 2008. MHC class II antigen presentation and immunological abnormalities due to deficiency of MHC class II and its associated genes. *Exp. Mol. Pathol.* **85**:40-44.

142. Jensen,P.E. 1998. Antigen processing: HLA-DO--a hitchhiking inhibitor of HLA-DM. *Curr. Biol.* **8**:R128-R131.
143. Tu,B.P., and Weissman,J.S. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.* **164**:341-346.
144. Kleizen,B., and Braakman,I. 2004. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**:343-349.
145. Oda,Y., Hosokawa,N., Wada,I., and Nagata,K. 2003. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* **299**:1394-1397.
146. Gillece,P., Luz,J.M., Lennarz,W.J., de La Cruz,F.J., and Romisch,K. 1999. Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J. Cell Biol.* **147**:1443-1456.
147. Tamura,T., Cormier,J.H., and Hebert,D.N. 2008. Sweet bays of ERAD. *Trends Biochem. Sci.* **33**:298-300.
148. Marks,M.S., Germain,R.N., and Bonifacino,J.S. 1995. Transient aggregation of major histocompatibility complex class II chains during assembly in normal spleen cells. *J. Biol. Chem.* **270**:10475-10481.
149. Anderson,K.S., and Cresswell,P. 1994. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* **13**:675-682.
150. Bonnerot,C., Marks,M.S., Cosson,P., Robertson,E.J., Bikoff,E.K., Germain,R.N., and Bonifacino,J.S. 1994. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* **13**:934-944.
151. Cotner,T., and Pious,D. 1995. HLA-DR beta chains enter into an aggregated complex containing GRP-78/BiP prior to their degradation by the pre-Golgi degradative pathway. *J. Biol. Chem.* **270**:2379-2386.
152. Smith,J.D., Solheim,J.C., Carreno,B.M., and Hansen,T.H. 1995. Characterization of class I MHC folding intermediates and their disparate interactions with peptide and beta 2-microglobulin. *Mol. Immunol.* **32**:531-540.
153. Miyazaki,J., Appella,E., and Ozato,K. 1986. Intracellular transport blockade caused by disruption of the disulfide bridge in the third external domain of major histocompatibility complex class I antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**:757-761.
154. Busch,R., Doebele,R.C., von,S.E., Fahrni,J., and Mellins,E.D. 1998. Aberrant intermolecular disulfide bonding in a mutant HLA-DM molecule: implications for assembly, maturation, and function. *J. Immunol.* **160**:734-743.

155. van, L.M., and Benham, A.M. 2006. The DMalpha and DMbeta chain cooperate in the oxidation and folding of HLA-DM. *J. Immunol.* **177**:5430-5439.
156. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
157. Kim, C.Y., Quarsten, H., Bergseng, E., Khosla, C., and Sollid, L.M. 2004. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:4175-4179.
158. Graham, F.L., and van der Eb, A.J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**:456-467.
159. Panina-Bordignon, P., Fu, X.T., Lanzavecchia, A., and Karr, R.W. 1992. Identification of HLA-DR alpha chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen. *J. Exp. Med.* **176**:1779-1784.
160. Deshaies, F., Diallo, D.A., Fortin, J.S., O'Rourke, H.M., Pezeshki, A.M., Bellemare-Pelletier, A., Raby, N., Bedard, N., Brunet, A., Denzin, L.K. et al 2008. Evidence for a human leucocyte antigen-DM-induced structural change in human leucocyte antigen-DObeta. *Immunology*. Epub, ahead of print.
161. Faubert, A., Samaan, A., and Thibodeau, J. 2002. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J. Biol. Chem.* **277**:2750-2755.
162. Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**:8125-8148.
163. Kozak, M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**:187-208.
164. Kozak, M. 1984. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature* **308**:241-246.
165. Gurtu, V., Yan, G., and Zhang, G. 1996. IRES bicistronic expression vectors for efficient creation of stable mammalian cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**:295-298.
166. Iera-Moreau, C., Chomarat, P., Audinot, V., Coge, F., Gillard, M., Martineau, Y., Boutin, J.A., and Prats, A.C. 2006. The use of IRES-based bicistronic vectors allows the stable expression of recombinant G-protein coupled receptors such as NPY5 and histamine 4. *Biochimie* **88**:737-746.
167. Tahara, H., Zitvogel, L., Storkus, W.J., Zeh, H.J., III, McKinney, T.G., Schreiber, R.D., Gubler, U., Robbins, P.D., and Lotze, M.T. 1995. Effective eradication of established murine tumors with IL-12 gene therapy using a polycistronic retroviral vector. *J. Immunol.* **154**:6466-6474.

168. Ellgaard,L., and Helenius,A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:181-191.
169. Cosson,P., and Bonifacino,J.S. 1992. Role of transmembrane domain interactions in the assembly of class II MHC molecules. *Science* **258**:659-662.
170. Hopner,S., Dickhaut,K., Hofstatter,M., Kramer,H., Ruckerl,D., Soderhall,J.A., Gupta,S., Marin-Esteban,V., Kuhne,R., Freund,C. et al 2006. Small organic compounds enhance antigen loading of class II major histocompatibility complex proteins by targeting the polymorphic P1 pocket. *J. Biol. Chem.* **281**:38535-38542.
171. Natarajan,S.K., Stern,L.J., and Sadegh-Nasseri,S. 1999. Sodium dodecyl sulfate stability of HLA-DR1 complexes correlates with burial of hydrophobic residues in pocket 1. *J. Immunol.* **162**:3463-3470.
172. Diallo,D.A. 2006. Caractérisation des molécules non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité humain HLA-DO et HLA-DM, mémoire de maîtrise, Université de Montréal. 103-113.
173. Doebele,R.C., Busch,R., Scott,H.M., Pashine,A., and Mellins,E.D. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity.* **13**:517-527.