

Université de Montréal

**Interaction moléculaire entre HLA-DR et la molécule  
non-classique HLA-DM**

Par

Amélie Faubert

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.

Avril 2002

© Amélie Faubert, 2002



W  
4  
U58  
2002  
V.095

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Interaction moléculaire entre HLA-DR et la molécule  
non-classique HLA-DM**

présenté par :

Amélie Faubert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr Hugo Soudeyns**

Président-rapporteur

**Dr Jacques Thibodeau**

Directeur de recherche

**Dr Walid Mourad**

Membre du jury

## RÉSUMÉ

Nous aborderons, dans ce travail, les éléments principaux impliqués dans la présentation antigénique par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Nous spécifierons plus en détails les rôles de la molécule HLA-DM, élément central de la présentation antigénique. HLA-DM catalyse la dissociation de CLIP et des peptides instables de la niche peptidique pour favoriser la présentation de peptides de haute affinité par les molécules du CMH de classe II. HLA-DM agit aussi à titre de chaperon pour favoriser la stabilité des CMH dans l'environnement hostile des lysosomes.

Dans ce travail, nous analyserons plus spécifiquement la liaison entre HLA-DM et les CMH de classe II. Nous examinerons l'implication d'une interface, incluant les résidus  $\alpha$ W62 et  $\beta$ W120, qui serait impliquée dans l'interaction entre HLA-DM et les molécules de classe II. Nous verrons que ces deux acides aminés hydrophobes exposés sur HLA-DM ne semblent pas importants pour la fonction et pour la liaison à HLA-DR. Pas la suite, nous émettrons quelques hypothèses, basées sur nos résultats supplémentaires de mutagenèse dirigée, sur différents sites de HLA-DM pouvant être impliqués dans sa fonction.

## **LISTE DES MOTS CLÉS**

Compartiments endosomaux/lysosomaux

Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CLIP

HLA-DO

Interaction protéique

Mutagenèse dirigée

Présentation antigénique

## SUMMARY

In this work, the main components implicated in antigenic presentation by class II major histocompatibility complex molecules (MHCII) will be described. We will specify the roles of HLA-DM, a central element of antigenic presentation. HLA-DM catalyzes the dissociation of CLIP and of unstable peptides in the binding groove to favour the presentation of high stability of peptide MHCII complexes. Furthermore, HLA-DM acts as a chaperone to increase the stability of MHC molecules in the lysosomal environment.

More specifically, We analyzed the liaison between HLA-DM and MHCII. Also, we studied the implication of an interface, including residues  $\alpha$ W62 and  $\beta$ W120, that may be implicated in the interaction between the two molecules. We concluded that these two hydrophobic amino acids exposed on HLA-DM are not important for the function and for the interaction with HLA-DR. Finally, our site-directed mutagenesis experiments led us to analyse novel sites that may be implicated in the various functions of HLA-DM.

## KEY WORDS LISTING

Antigenic presentation

Class II major histocompatibility complex

CLIP

Endosomal compartment

HLA-DO

Protein interaction

Site-directed mutagenesis

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	i
<b>LISTE DES MOTS CLÉS.....</b>	ii
<b>SUMMARY.....</b>	iii
<b>KEY WORDS LISTING.....</b>	iv
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	v
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	x
Revue de littérature.....	x
Article.....	xi
Discussion.....	xi
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	xii
<b>DÉDICACE.....</b>	xiv
<b>CHAPITRE 1, REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>15</b>
<b>1.0. INTRODUCTION.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. LES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II.....</b>	<b>18</b>
1.1.1. Le locus du complexe majeur d'histocompatibilité.....	18
1.1.2. La structure des molécules de classe II.....	19
1.1.3. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles...	21
1.1.4. Les peptides associés au CMHII.....	21
1.1.5. La liaison du peptide dans la niche peptidique.....	22
<b>1.2. LA PRÉSENTATION PAR LES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II.....</b>	<b>23</b>
1.2.1. La voie de présentation des CMH de classe II.....	23
<b>1.3. LA MOLÉCULE HLA-DM.....</b>	<b>27</b>
1.3.1. La découverte de HLA-DM.....	27
1.3.2. La structure de HLA-DM.....	28

## TABLE DES MATIÈRES (Suite)

1.3.3. HLA-DM : Une molécule non-classique.....	30
1.3.4. L'expression de HLA-DM.....	32
1.3.5. La localisation sub-cellulaire de HLA-DM.....	32
1.3.6. La relâche de CLIP.....	33
1.3.7. La dépendance allélique de la relâche de CLIP.....	34
1.3.8. La relâche de peptides instables.....	35
1.3.9. L'activité catalytique de HLA-DM sur les CMHII.....	37
1.3.10. L'implication des ponts hydrogènes.....	37
1.3.11. L'action de HLA-DM sur la voie de recyclage.....	38
1.3.12. HLA-DM : Un chaperon.....	39
1.3.13. Les fonctions de HLA-DM <i>in vivo</i> .....	41
<b>1.4. LA MOLÉCULE HLA-DO.....</b>	<b>43</b>
1.4.1. La molécule non-classique HLA-DO.....	43
1.4.2. Les fonctions de HLA-DO.....	44
1.4.3. HLA-DO : Un co-chaperon.....	47
<b>1.5. L'IMPLICATION DE HLA-DM ET DE HLA-DO DANS LA PATHOLOGIE.....</b>	<b>47</b>
1.5.1. L'implication de HLA-DM dans l'autoimmunité.....	47
1.5.2. L'implication de HLA-DM et de HLA-DO dans la sélection thymique.....	48
1.5.3. Le rôle de HLA-DM dans les cancers.....	49
1.5.4. L'implication de HLA-DM dans l'évasion immunitaire.....	50
<b>1.6. LES INTÉRACTIONS ENTRE LES MOLÉCULES DE CLASSE II.....</b>	<b>50</b>
1.6.1. La liaison directe entre HLA-DM et HLA-DR.....	50
1.6.2. La liaison entre HLA-DM et HLA-DO.....	54
1.6.3. Les Hypothèses sur les sites fonctionnels de HLA-DM.....	55

## TABLE DES MATIÈRES (Suite)

1.6.4. L'hypothèse d'une interaction entre résidus hydrophobes	56
<b>1.7. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL.....</b>	<b>58</b>
<b>CHAPITRE 2, ARTICLE.....</b>	<b>59</b>
<b>2.0. FUNCTIONAL ANALYSIS OF TRYPTOPHANS <math>\alpha</math>62 AND <math>\beta</math>120 ON HLA-DM.....</b>	<b>60</b>
<b>2.1. SUMMARY.....</b>	<b>61</b>
<b>2.2. RÉSUMÉ.....</b>	<b>62</b>
<b>2.3. INTRODUCTION.....</b>	<b>63</b>
<b>2.4. EXPERIMENTAL PROCEDURES.....</b>	<b>65</b>
2.4.1. Plasmids.....	65
2.4.2. DM $\alpha$ and DM $\beta$ mutagenesis.....	65
2.4.3. Antibodies.....	66
2.4.4. Cell lines and transfections.....	66
2.4.5. Flow Cytometry Analysis.....	67
2.4.6. Fluorescence Microscopy.....	67
2.4.7. Immunoprecipitations and Western Blotting.....	67
<b>2.5. RESULTS.....</b>	<b>69</b>
<b>2.6. FIGURES.....</b>	<b>73</b>
<b>2.7. DISCUSSION.....</b>	<b>80</b>
<b>2.8. ABBREVIATIONS.....</b>	<b>83</b>
<b>2.9. ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>84</b>
<b>2.10. REFERENCES.....</b>	<b>85</b>

## TABLE DES MATIÈRES (Suite)

<b>CHAPITRE 3, RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....</b>	<b>89</b>
<b>3.0. L'ÉTUDE DE QUATRE CHARGES DE HLA-DM.....</b>	<b>90</b>
<b>3.1. L'ÉTUDE DE LA CYSTÉINE LIBRE DE HLA-DM.....</b>	<b>92</b>
<b>CHAPITRE 4, DISCUSSION</b>	<b>95</b>
<b>4.0. LA PRODUCTION DE MOLÉCULES CHIMÉRIQUES.....</b>	<b>96</b>
<b>4.1. L'INTERACTION HYDROPHOBIQUE ENTRE HLA-DR ET   HLA-DM.....</b>	<b>97</b>
4.1.1. L'implication des résidus W62 et W120 de HLA-DM.....	97
4.1.2. Autres résidus hydrophobes potentiellement impliqués dans l'interaction.....	98
<b>4.2. L'INTERACTION DE TYPE PONT SALIN ENTRE HLA-DR   ET HLA-DM.....</b>	<b>101</b>
4.2.1. Autres résidus chargés potentiellement impliqués dans l'interaction.....	101
<b>4.3. LES MECANISMES D'ACTION DE HLA-DM.....</b>	<b>103</b>
4.3.1. Le modèle d'interaction entre HLA-DM et HLA-DR.....	104
4.3.2. Une interaction en tête à tête.....	106
4.3.3. Les autres moyens de cerner les résidus importants pour l'interaction.....	107
4.4.4. Faire une pierre deux coups.....	107
<b>CHAPITRE 5, CONCLUSION.....</b>	<b>109</b>
<b>CHAPITRE 6, RÉFÉRENCES.....</b>	<b>111</b>

## TABLE DES MATIÈRES (Suite)

<b>APPENDICES.....</b>	<b>xxxxviii</b>
<b>Figure A.1.</b> La position des mutations de charge effectuées sur HLA-DM.....	cxxxix
<b>Figure A.2.</b> Les mutations de charges K109A, K115A, R93A et R95A n'affectent pas la catalyse de CLIP par HLA-DM.....	cxi
<b>Figure A.3.</b> Les mutants K109A, K115A, R93A, R95A et C45A sortent du réticulum endoplasmique et s'associent à HLA-DO.....	cxli
<b>Figure A.4.</b> La position de la cystéine libre mutée sur HLA-DM.....	cxlii
<b>Figure A.5.</b> La mutation de la cystéine libre n'affecte pas la catalyse de CLIP par HLA-DM.....	cxliii
<b>Figure A.6.</b> Les résidus hydrophobes conservés dans la portion luminale de la protéine mature HLA-DM $\alpha$ .....	cxliv
<b>Figure A.7.</b> Les résidus hydrophobes conservés dans la portion luminale de la protéine mature HLA-DM $\beta$ .....	cxlv
<b>Figure A.8.</b> Les résidus chargés positivement conservés dans la portion luminale de la protéine mature HLA-DM $\alpha$ .....	cxlvi
<b>Figure A.9.</b> Les résidus chargés positivement conservés dans la portion luminale de la protéine mature HLA-DM $\beta$ .....	cxlvii
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>cxlviii</b>

## LISTE DES FIGURES

### Revue de littérature

<b>Figure 1.1.</b> La présentation par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.....	17
<b>Figure 1.2.</b> Localisation et organisation du locus du classe II humain sur le chromosome 6.....	19
<b>Figure 1.3.</b> Structure des molécules de classe II, interaction avec le peptide et le TCR.....	20
<b>Figure 1.4.</b> Niche peptidique d'une molécule de classe II et ses différentes poches peptidiques.....	23
<b>Figure 1.5.</b> Les domaines fonctionnels et structuraux de la chaîne invariante .....	24
<b>Figure 1.6.</b> La voie de présentation des molécules de classe II.....	26
<b>Figure 1.7.</b> Structure cristalline de HLA-DM.....	30
<b>Figure 1.8.</b> Comparaison de structure des molécules du CMH.....	31
<b>Figure 1.9.</b> La niche peptidique de HLA-DM.....	31
<b>Figure 1.10.</b> L'activité chaperonne de HLA-DM dans les compartiments endosomaux/lysosomaux.....	41
<b>Figure 1.11.</b> Modèle de présentation antigénique entre différentes CPA, selon la présence ou l'absence de HLA-DO.....	46
<b>Figure 1.12.</b> La Liaison entre HLA-DR et HLA-DM.....	51
<b>Figure 1.13.</b> Détermination des sites importants sur la molécule DR3/CLIP pour l'association avec HLA-DM .....	53
<b>Figure 1.14.</b> Illustration de la distribution des résidus cystéines dans le domaine extracytoplasmique des chaînes $\alpha$ et $\beta$ de HLA-DM...	54
<b>Figure 1.15.</b> Les modèles de liaison proposés par le groupe de Fremont.....	56

## LISTE DES FIGURES (Suite)

### Article

<b>Figure 2.1.</b> Position of mutations on HLA-DM.....	73
<b>Figure 2.2.</b> Expression of HLA-DR, invariant chain and HLA-DM in transfected HeLa cells. ....	74
<b>Figure 2.3.</b> Mutants of HLA-DM localize in the endocytic pathway.....	75
<b>Figure 2.4.</b> Mutations on HLA-DM do not impair CLIP release.....	76
<b>Figure 2.5.</b> HLA-DM mutants bind to HLA-DR.....	77
<b>Figure 2.6.</b> Expression of HLA-DM and HLA-DO in transfected HeLa cells.....	78
<b>Figure 2.7.</b> HLA-DM mutants bind to HLA-DO.....	79

### Discussion

<b>Figure 4.1.</b> Molécules chimériques créées.....	96
<b>Figure 4.2.</b> Alignement de séquence de DM $\alpha$ et de DM $\beta$ .....	99
<b>Figure 4.3.</b> Résidus hydrophobes (I, F, W ou Y) exposés sur la structure cristalline humaine de HLA-DM.....	100
<b>Figure 4.4.</b> Résidus chargés positivement (H/K/R) exposés sur la structure cristalline de HLA-DM.....	102
<b>Figure 4.5.</b> Modèle de l'interaction entre HLA-DM et HLA-DR d'après le groupe de Wiley.....	105
<b>Figure 4.6.</b> Modèle de l'interaction entre HLA-DM et HLA-DR d'après le groupe de Mellins.....	105

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADNc : ADN complémentaire
- ANS : Acide 8-anilino-1-naphthalenesulfonique
- BCR : Récepteur des lymphocytes B
- CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
- CLIP : *Class II-associated invariant chain peptide*
- CHAPS : 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate
- CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CMHI : CMH de classe I
- CMHII : CMH de classe II
- CMHIIP : Complexe MHC/peptide
- COOH : C-terminal
- cTEC : Cellules épithéliales thymiques corticales
- DM : HLA-DM
- DO : HLA-DO
- DR : HLA-DR
- FcR : Récepteur Fc
- FliC : Protéine flagellaire majeure
- HA : Hémagglutinine du virus Influenza
- HLA : *Human leukocyte antigen*
- IDDM : *Insulin-Dependant Diabetes Mellitus*
- Ig : Immunoglobuline
- Ii : Chaîne invariante
- KDa : Kilodaltons
- LMP : Large protéase multifonctionnelle
- MIIC : *Major-histocompatibility-complex class II compartments*
- MBP : Protéine basale de myéline

## LISTE DES ABRÉVIATIONS (Suite)

MHC : *Major histocompatibility complex*

MIg : Immunoglobuline membranaire

mTEC : Cellules épithéliales thymiques médullaires

NH<sub>2</sub> : N-terminal

pBS : pBluescript

PCR : *Polymerase chain reaction*

PSM $\beta$  : Protéosome  $\beta$

RE : Réticulum endoplasmique

SDS : Sodium dodécyl sulfate

TAP : Transporteur associé avec la transformation antigénique

TAPBP : Protéine liée à TAP (tapasine)

TCR : *T cell receptor*

TM : Transmembranaire

TNF $\alpha$  : *Tumor necrosis factor  $\alpha$*

TrxA : Thioredoxine

*À tous ceux que j'aime,  
pour m'avoir soutenue,  
aimée et encouragée,  
MERCI...*

**CHAPITRE 1**

**REVUE DE**

**LITTÉRATURE**

## 1.0. INTRODUCTION

La reconnaissance entre une cellule présentatrice d'antigènes et un lymphocyte T est l'évènement clé de la réponse immunitaire acquise et spécifique. Cette rencontre permet d'activer les lymphocytes T, et par cascade tout le système immunitaire, ce qui permet de désarmer les pathogènes.

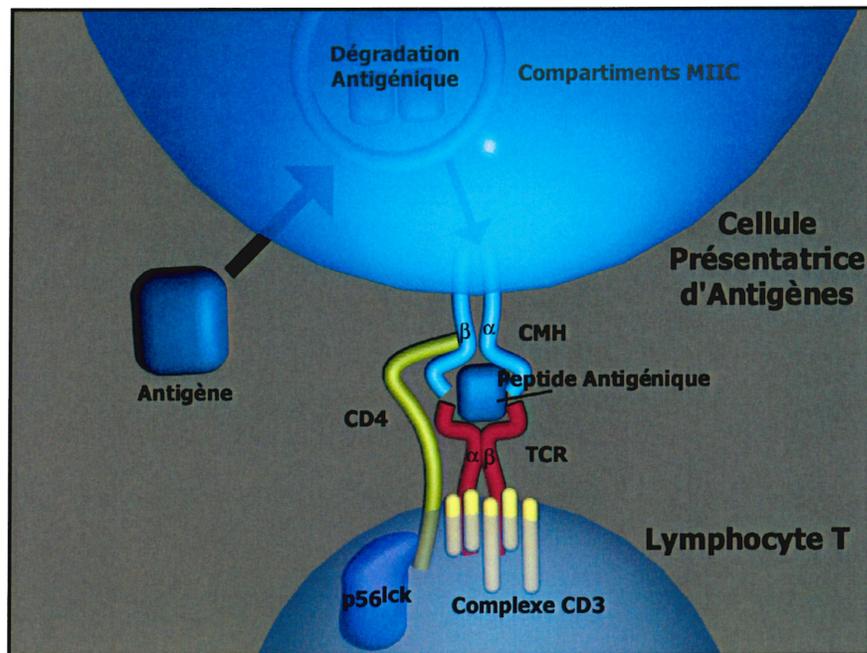
Deux types de lymphocytes peuvent être activés par les cellules présentatrices d'antigènes; les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Dans cette étude, nous couvrirons certains cheminements moléculaires de la présentation antigénique servant à activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [1].

Cette présentation d'antigènes implique la rencontre d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) liant un peptide avec le TCR<sup>1</sup> approprié d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> (Figure 1.1, p.17)<sup>2</sup>. En comparaison avec les molécules du CMHI, les molécules du CMHII servent principalement à présenter les peptides exogènes issus de bactéries, de virus, de protozoaires, de protéines solubles ou de toxines externes [1].

---

<sup>1</sup>TCR abréviation de **T Cell Receptor** (Récepteur des lymphocytes T).

<sup>2</sup> Notons l'importance des travaux effectués dans le domaine par le Dr **Strominger** de l'Université de Harvard. Ce dernier a effectué d'énormes contributions par l'étude de la molécule CD4, du TCR et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, tant au niveau de la structure/fonction qu'au niveau de l'organisation génétique.



**Figure 1.1.** La présentation par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII). Une cellule présentatrice d'antigènes professionnelle possède la capacité de dégrader les antigènes dans les MIIC (*major-histocompatibility-complex (MHC) class II compartment*) et de présenter des fragments peptidiques en complexe avec les molécules du CMH au TCR d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup>.

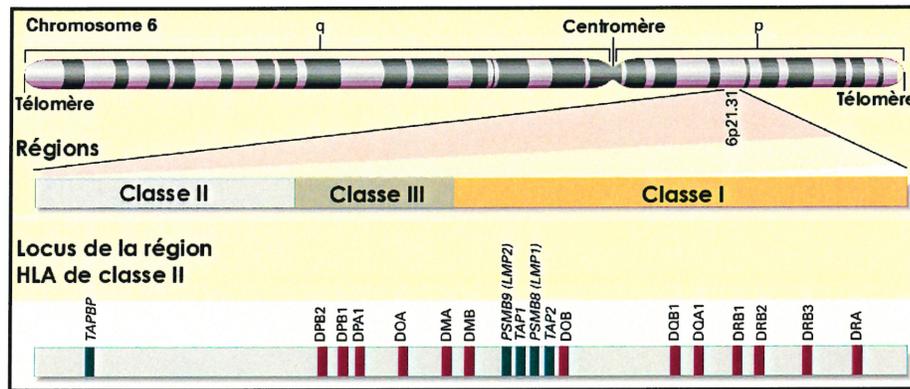
Suite à la rencontre d'une cellule présentatrice possédant le bon peptide et d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup>, la reconnaissance du complexe par le lymphocyte permettra l'activation cellulaire, la production de cytokines (IL-2, IL4, IL-5 ou interféron  $\gamma$ ), ce qui conduira entre autres à la prolifération des lymphocytes B et T, à l'activation des macrophages et à la différenciation des lymphocytes B [2].

## **1.1. LES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II**

### **1.1.1. Le locus du complexe majeur d'histocompatibilité**

Le locus du complexe majeur d'histocompatibilité humain est aussi nommé HLA (**H**uman **L**eucocyte **A**ntigen). Il est localisé sur le chromosome 6 du génome humain et son homologue est situé sur le chromosome 17 de la souris (Figure 1.2, p.18). Les molécules du CMH de classe II peuvent être de trois types; soit DP, DQ et DR. Il est intéressant de noter que les gènes du locus du classe II ont été parmi les premiers clonés. Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité possèdent aussi le plus grand taux de polymorphismes de tout le génome [3]<sup>3</sup>.

La région promotrice des gènes du CMH de classe II contient les motifs S, X, X2 et Y. Les activateurs transcriptionnels CIITA et RFX-5 sont nécessaires à une bonne transcription [4].



**Figure 1.2. Localisation et organisation du locus du classe II humain sur le chromosome 6. Seul les gènes exprimés sont indiqués. LMP : Large protéase multifonctionnelle, PSMB 8 et 9 : Protéosome  $\beta$  8 et 9, TAP1 et 2 : transporteur associé avec la transformation antigénique 1 et 2 et TAPBP : Protéine liée à TAP (tapasine) (Adapté de Klein and Sato, New England Journal of Medicine, 2000) [5;6] .**

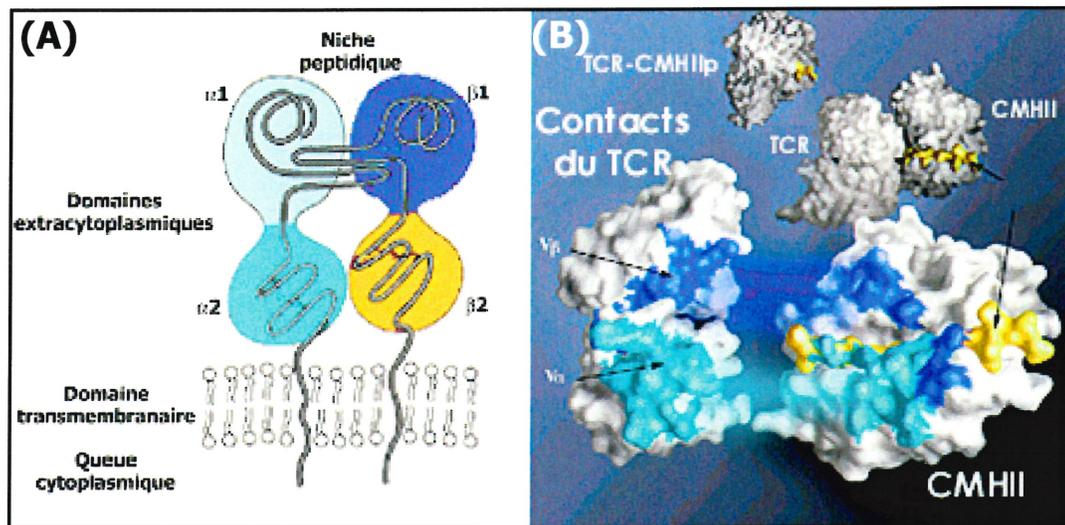
### 1.1.2. La structure des molécules de classe II

Les molécules de classe II classiques possèdent deux chaînes membranaires glycoprotéiques, l'une  $\alpha$  et l'autre  $\beta$  (Figure 1.3, p.20), qui s'associent entre-elles de façon non-covalente dans le réticulum endoplasmique (RE). Ces deux chaînes possèdent une queue cytoplasmique de 12 à 15 acides aminés et une région transmembranaire de 20 à 25 acides aminés. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  possèdent approximativement un poids respectif de 33 KDa et de 28 KDa.

Les domaines  $\alpha 1\beta 1$  s'associent entre-eux pour former la niche peptidique et sont aussi responsables de la reconnaissance par le TCR, tandis que les domaines  $\alpha 2\beta 2$  contiennent un pont disulfure et ressemblent

<sup>3</sup> Les travaux du Dr **Trowsdale** de l'Université de Cambridge sont d'une importance remarquable dans le domaine de l'organisation génétique du locus du CMH.

structurellement au domaine constant des immunoglobulines. La structure globale des régions  $\alpha_1\beta_1$  consiste en huit feuillets  $\beta$  et deux hélices  $\alpha$  anti-parallèles. L'arrangement des deux hélices  $\alpha$  permet la liaison d'un peptide (Figure 1.3, p.20). La plupart des résidus polymorphiques sont orientés à l'intérieur des poches de la niche peptidique et contribuent à la dépendance allélique de la liaison peptidique [7;8].



**Figure 1.3. Structure des molécules de classe II et interaction avec le peptide et le TCR. (A) Les molécules du CMH de classe II sont formées de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  et de quatre domaines : le domaine de liaison peptidique ( $\alpha_1$  et  $\beta_1$ ), le domaine immunoglobuline-like ( $\alpha_2$  et  $\beta_2$ ), la région transmembranaire et la queue cytoplasmique. (B) La structure du TCR en interaction avec le peptide (jaune) lié au CMH de classe II (CMHIIp). Les domaines du CMH-peptide qui lient le TCR sont indiqués en bleu ( $V_\alpha$  : bleu pâle,  $V_\beta$  : bleu foncé) (Adapté de [www-biology.ucsd.edu/classes/bild36.FA00/lecture\\_11\\_00.html](http://www-biology.ucsd.edu/classes/bild36.FA00/lecture_11_00.html) et de [www.anl.gov/OPA/news99/news991203.html](http://www.anl.gov/OPA/news99/news991203.html)) [182;183].**

### 1.1.3. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles

La présentation de peptides exogènes par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II s'effectuera principalement par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA), telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes B, les macrophages et les cellules épithéliales thymiques, mais aussi par toutes autres cellules activées par l'interféron  $\gamma$  ou par le  $\text{TNF}\alpha^4$  [16].

### 1.1.4. Les peptides associés au CMHII

Les antigènes exogènes peuvent accéder aux endosomes par différents procédés ; pinocytose (cellules dendritiques), phagocytose (macrophages) ou la médiation par un récepteur<sup>5</sup> [9].

Les CMH de classe II lieront des peptides exogènes de 11 à 25 acides aminés dans les compartiments acides, tels que les lysosomes (MIIC). Ces compartiments renferment un pH bas et des conditions réductrices, qui contribuent à augmenter l'activité protéolytique, ce qui conduira à la dénaturation des protéines et à la dégradation protéinique [10]. Il semble que le répertoire de protéases varie d'un type cellulaire à l'autre, ouvrant la possibilité de génération de différents épitopes selon le modèle de cellules présentatrices d'antigènes [11].

La génération de peptides antigéniques pourra donc varier selon le mode d'entrée, selon la sensibilité à l'activité protéolytique des protéines et selon le nombre de protéases cellulaires.

---

<sup>4</sup>  $\text{TNF}\alpha$  abréviation de **T**umor **N**ecrosis **F**actor  $\alpha$  (Facteur de nécrose tumorale).

<sup>5</sup> Entre autres les récepteurs des lymphocytes B (BCR), les récepteurs Fc (FcR), les lectines, les récepteurs mannoses et les récepteurs non-spécifiques « *scavengers* ».

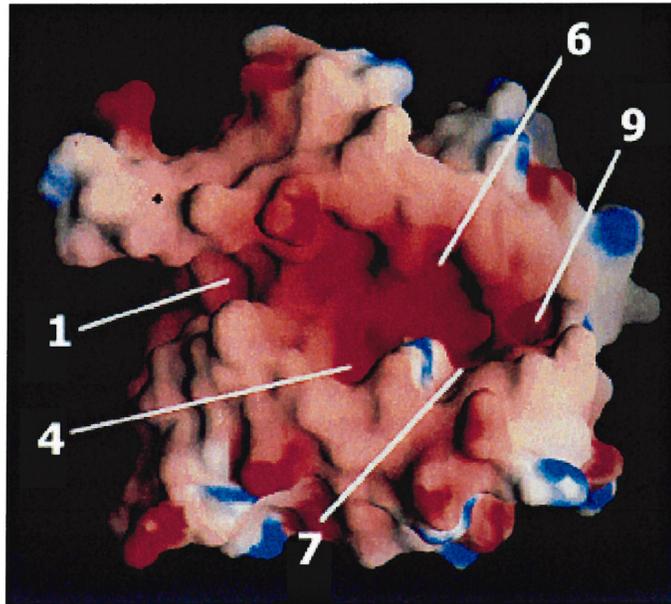
### 1.1.5. La liaison du peptide dans la niche peptidique

Le peptide doit posséder des ancrés<sup>6</sup> formées par ses chaînes latérales. Ces acides aminés, qui peuvent être différents dans les 50 à 100 variants alléliques des molécules de classe II, se lient aux poches de la niche peptidique. De plus, les résidus incompatibles avec la liaison peptidique devront être absents.

La molécule HLA-DR1 possède une poche non polaire, qui peut accommoder un acide aminé hydrophobe du peptide. Cette interaction semble dominante entre la niche peptidique et le peptide [12]. Les résidus polymorphiques de la niche peptidique agencent les chaînes latérales du peptide et ce dernier demeure fixé par la formation de liaisons hydrogènes entre le squelette peptidique et les résidus conservés de la niche (Figure 1.4, p.22) [13]. Dans une majorité de classe II, les ponts hydrogènes sont créés par la chaîne  $\alpha$  aux positions  $\alpha 53$ ,  $\alpha 62$ ,  $\alpha 69$  et  $\alpha 76$  et par la chaîne  $\beta$  aux positions  $\beta 57$ ,  $\beta 61$ ,  $\beta 81$  et  $\beta 82$ . Ces interactions permettent la stabilisation du peptide dans une conformation fixée [14]. La première poche peptidique, qui fait le contact avec la partie N-terminale du peptide lié, possède les ponts hydrogènes les plus conservés, formés par  $\beta 81$ ,  $\beta 82$  et  $\alpha 53$  [15].

---

<sup>6</sup> Nommées « *Anchors* ».



**Figure 1.4. Niche peptidique d'une molécule de classe II et ses différentes poches peptidiques (Adapté de Paul et al., *Fundamental Immunology*, 1999) [184].**

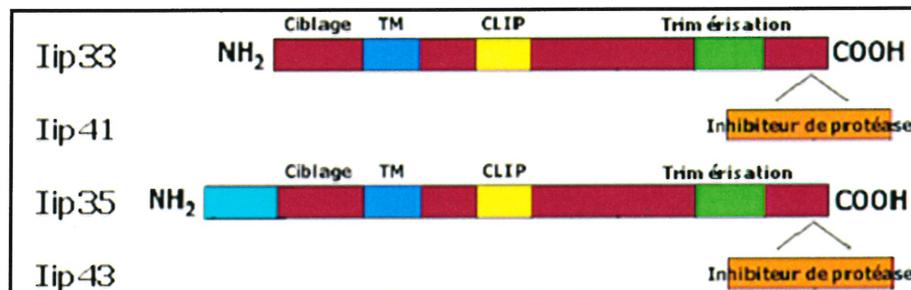
## **1.2. LA PRÉSENTATION PAR LES MOLÉCULES DU CMH DE CLASSE II**

### **1.2.1. La voie de présentation des CMH de classe II**

Après la biosynthèse des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH de classe II dans le réticulum endoplasmique (RE), il y aura formation d'intermédiaires de maturation avec plusieurs chaperons<sup>7</sup>, puis formation d'un complexe nanomérique, composé de trois CMH et de trois chaînes invariantes (Ii ou CD74)  $((\alpha\beta)_3Ii_3)$  [17-19]. La trimérisation du complexe est rendue possible

<sup>7</sup> Entre autres Bip, Erp72 et la calnexine.

par la région transmembranaire de Ii et par son domaine luminal de trimérisation (Figure 1.5, p.24) [20;21].



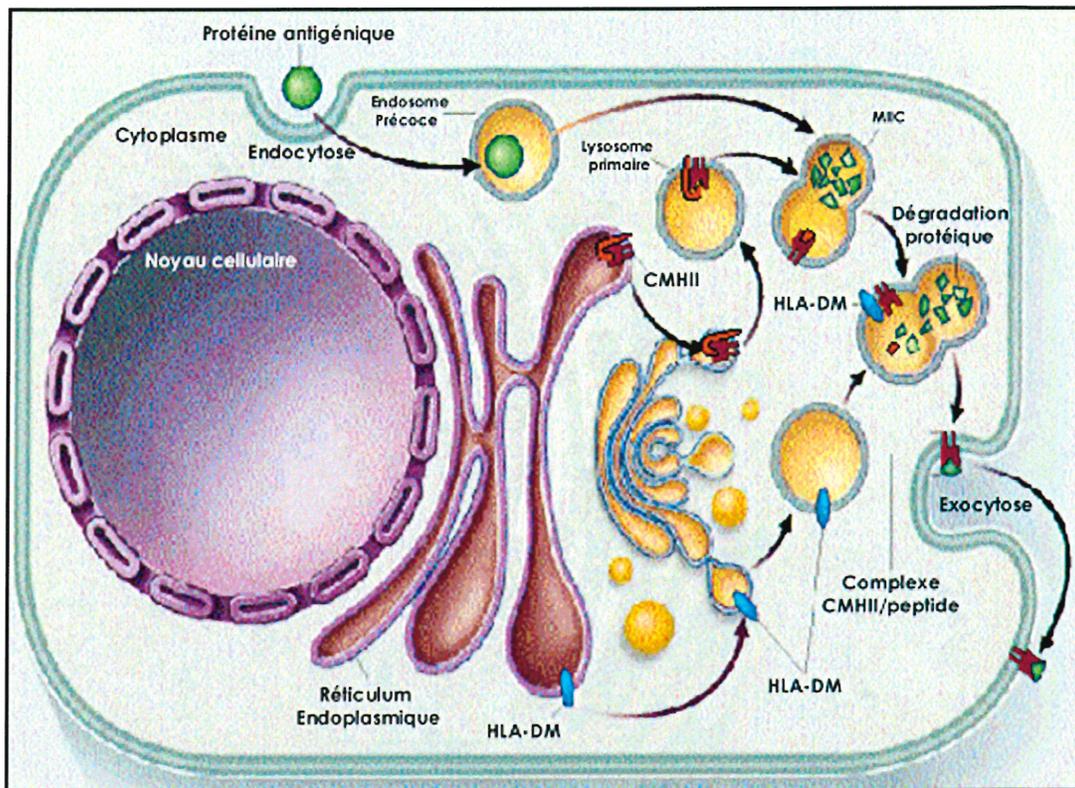
**Figure 1.5. Les domaines fonctionnels et structuraux de la chaîne invariante (Ii). Quatre différentes isoformes de Ii peuvent être exprimées chez l'humain; IiP33, IiP41, IiP35 et IiP43. IiP41 et IiP43 contiennent un exon additionnel encodant 64 acides aminés (orangé). IiP35 et IiP43 sont exprimées de façon différentielle suite à une initiation de transcription différente et contiennent un segment de 16 acides aminés qui encode un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique (bleu). La trimérisation est rendue possible grâce au domaine de trimérisation (vert) et grâce à la région transmembranaire (TM; bleu foncé). Respectivement NH<sub>2</sub>: N-terminal et COOH: C-terminal (Adapté de Pieters and al., Current Opinion in Immunology, 1997) [22].**

La chaîne invariante, présente en quatre isoformes chez l'humain (Figure 1.5, p.24), permet le maintien de la structure tertiaire et quaternaire, prévient l'agrégation des CMH, empêche le complexe de lier des polypeptides prématurément dans le RE et finalement procure au complexe un motif lui permettant de sortir du RE pour se diriger vers les MIIC (Figure 1.6, p.25) [23-28]. En effet, la queue cytoplasmique de la chaîne invariante possède des signaux de type dileucine [29-31]. Le complexe pourra alors se diriger vers les compartiments endosomaux où certaines protéases (cathepsines L et S) contribueront à sa protéolyse [32-35]. Il y aura donc perte du signal dileucine, de la fonction de chaperonne de Ii et le complexe

de classe II pourra se diriger vers la surface cellulaire<sup>8</sup>. L'absence de chaîne invariante forme des hétérodimères de classe II agrégés faiblement exprimés en surface cellulaire chez les splénocytes de souris *knock-out* [36;37].

---

<sup>8</sup> Les travaux impressionnants du Dr **Cresswell** de l'Université Yale ont permis d'élucider plusieurs mécanismes régulant les fonctions de la chaîne invariante, ainsi que les mécanismes de transport de plusieurs molécules de classe II.



**Figure 1.6.** La voie de présentation des molécules de classe II. Les protéines antigéniques (vert) sont internalisées par endocytose. Les molécules de classe II (CMHII) (rouge) sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, s'associent avec la chaîne invariante (orangé) et se rendent au lysosome primaire. La fusion des endosomes et des lysosomes forme les MIIC (*major-histocompatibility-complex (MHC) class II compartment*). Ces compartiments sont un environnement propice à la dégradation des protéines internalisées en peptides et de même qu'à la dégradation de la chaîne invariante. HLA-DM (bleu) catalyse la dissociation de CLIP (peptide issu de la chaîne invariante) pour permettre à la molécule de classe II de lier des peptides exogènes. Les complexes CMHII/peptide sont alors exportés à la surface cellulaire (Adapté de Klein et Sato, *New England Journal of Medicine*, 2000) [5;6].

Finalement, un seul peptide dérivé de la chaîne invariante (résidus 81 à 104) nommé CLIP (**C**lass II **I**nvariant Chain **D**erived **P**eptide), sera protégé

de cette digestion par la niche peptidique du complexe CMH (Figure 1.5, p.24) [23;38-40].

CLIP préserve la conformation de la niche peptidique et prévient aussi la liaison prématurée de peptides et de polypeptides [41;42]. En effet, un CMHII sans peptide aura tendance à s'agréger et à se désassembler au pH acide des endosomes, par l'exposition d'une surface hydrophobique de la niche peptidique, qui conduira à un réarrangement structurel et finalement à la dénaturation [43].

### **1.3. LA MOLÉCULE HLA-DM**

L'événement clé de la présentation par les molécules de classe II est donc la libération de CLIP [44;45]. La liaison de CLIP à tous les allèles de classe II peut sembler étonnante, étant donné le large polymorphisme de la niche peptidique. En effet, CLIP se lie au même site et de la même façon que les peptides antigéniques [38]. La libération de CLIP, qui ne s'effectue pas spontanément la plupart du temps, permettra à d'autres peptides de pouvoir s'associer aux molécules classes II et finalement d'arriver à activer les lymphocytes T.

#### **1.3.1. La découverte de HLA-DM**

Il y a plus de dix ans, les groupes de Unanue et de Grey ont démontré que les classes II purifiés pouvaient lier de petits peptides antigéniques synthétiques *in vitro* sans l'aide de molécules accessoires [46;47]. Depuis ce temps, plusieurs groupes ont purifié et séquencé les peptides du soi liant naturellement l'hétérodimère, ce qui a permis de clarifier les motifs qui

forment la base de la spécificité de liaison entre les classes II et le peptide [48]. La comparaison entre les peptides du soi et les peptides synthétiques a démontré des séquences similaires, mais non identiques [10].

Lors de diverses études sur la présentation par les molécules de classe II, certaines autres contradictions existaient. Premièrement, les peptides s'associaient beaucoup plus rapidement *in vivo* qu'*in vitro* sur les CMH de classe II [49-52]. Deuxièmement, certaines lignées de cellules, B-LCL<sup>9</sup> et T2<sup>10</sup>, ayant une délétion sur le locus du classe II, ne pouvaient présenter des protéines antigéniques exogènes, mais pouvaient néanmoins présenter des peptides exogènes via la livraison par des récepteurs [53-55]. En étudiant ces types cellulaires de façon plus approfondie, des études ont démontré que ces cellules présentaient principalement CLIP en surface cellulaire et que les classes II exprimés étaient très instables<sup>11</sup> [39;40]. Suite à ces résultats, les chercheurs émirent l'hypothèse selon laquelle une autre molécule interviendrait dans l'élaboration du répertoire présenté en surface. Finalement, des études de complémentation ont permis de démontrer que la délétion affectait le gène DMA et/ou DMB. Irrémédiablement, la transfection des ADNc de DMA et de DMB permettait de retrouver le phénotype sauvage [56-58].

### 1.3.2. La structure de HLA-DM

H2-M, homologue murin de HLA-DM, est constitutivement exprimée dans les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles et aussi dans les fractions corticales et médullaires thymiques [59;60]. HLA-DM, possède

---

<sup>9</sup> Lignée cellulaire lymphoblastoïde B.

<sup>10</sup> Hybride entre un lymphocyte B et T.

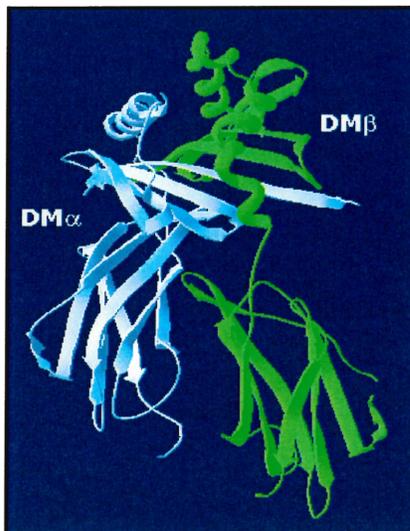
<sup>11</sup> L'instabilité peut être démontrée par la dissociation en sodium dodécyl sulphate. Ce détergent sert de mesure de la forme mature des molécules de classe II liant le bon peptide. Les bases structurelles de la stabilité au SDS ne sont pas connues.

deux chaînes; DM $\alpha$  protéine mature de 26 KDa avec deux sites de glycolysation (33-35 KDa) et DM $\beta$  de 27 KDa avec un site de glycolysation (30-31 KDa), qui s'associent pour former la forme active dans le réticulum endoplasmique. Des études de complémentation ont conduit à la découverte que seul l'hétérodimère était fonctionnel [56].

HLA-DM possède huit feuillets  $\beta$  et deux hélices  $\alpha$  dans son domaine présumé de liaison peptidique. La structure globale de DM contient des domaines immunoglobuline-*like*  $\alpha_2\beta_2$  et des feuillets  $\beta$  qui permettent l'association des deux chaînes ( $\alpha_1\beta_1$ ) (Figure 1.7, p.29). Le domaine  $\beta_2$  serait relié structurellement aux molécules de classe I. HLA-DM possède aussi deux ponts disulfures de plus que les molécules de classe II classiques (5 cystéines dans  $\alpha_1\beta_1$ ), qui pourraient être importants pour les fonctions de la protéine. Ces cystéines permettent la structure fermée de la niche peptidique et préviennent la flexibilité des domaines  $\alpha_1$  et  $\beta_1$ . HLA-DM possède aussi une poche centrale chargée négativement dont la fonction est inconnue [61;62]<sup>12</sup>.

---

<sup>12</sup> Notons la contribution saillante du Dr **Wiley** de l'Université d'Harvard, qui a effectué la structure cristalline de plusieurs molécules du CMH ainsi que la structure de HLA-DM.

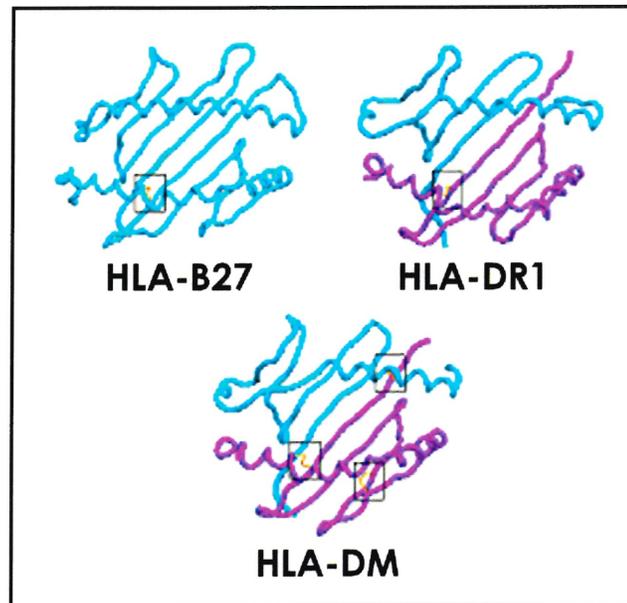


**Figure 1.7. Structure cristalline de HLA-DM. En bleu la chaîne  $\alpha$  et en vert la chaîne  $\beta$ . Les numéros d'accèsion sont NM\_006120 pour  $DM\alpha$  et NM\_002118 pour  $DM\beta$  humain [60]. Le modèle moléculaire a été réalisé à l'aide de la banque de données protéiques numéro 1HDM et analysé par *Swiss PDB Viewer* [62].**

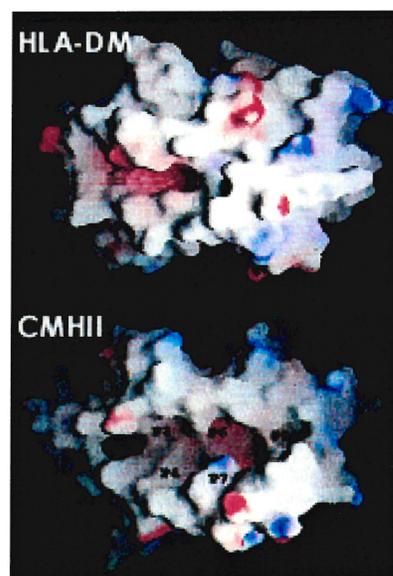
Les CPA murines possèdent deux chaînes  $DM\beta$ , qui sont à 96% identiques. L'importante partie de la dissemblance est située sur le domaine  $\beta 1$  (ou se retrouve la niche peptidique des classes II classiques). Malgré cela, ces deux différentes chaînes  $\beta$  ne semblent pas avoir de fonctions différentes [63-66].

### **1.3.3. HLA-DM: Une molécule non-classique**

HLA-DM, qui présente une grande homologie structurale avec les molécules de classe I et II classiques, est une molécule de classe II non-classique (Figure 1.8, p.30). Elle n'est pas présente à la surface cellulaire, est peu polymorphique et ne lie pas de peptides [67-69]. En effet, sa niche peptidique est fermée par ses domaines  $\alpha 1\beta 1$  qui interagissent largement entre-eux (Figure 1.9, p.30) [60-62].



**Figure 1.8.** Comparaison de structure des molécules du CMH. Homologie de structure entre HLA-B27, HLA-DR1 et HLA-DM. Les carrés représentent les ponts disulfures formés sur les hétérodimères matures (Adapté de <http://depts.washington.edu> ) [185].



**Figure 1.9.** La niche peptidique de HLA-DM. Niche peptidique fermée de HLA-DM (Haut) en comparaison avec la niche peptidique d'une molécule de classe II classique (Adapté de Fremont et al., *Immunity*, 1998) [61].

#### 1.3.4. L'expression de HLA-DM

Le gène encodant HLA-DM est coréglulé avec ceux des hétérodimères classiques, dispose aussi des boîtes promotrices X et Y, mais possède un niveau de transcription plus bas que le CMHII classique [70;71]. Cependant, dans le double *knock-out* CIITA et RFX-5, un niveau basal de DM persiste, d'où la supposition qu'il y aurait un autre contrôle transcriptionnel de cette molécule [72;73]. De plus, certains mutants qui expriment un niveau normal de molécules de classe II ont été identifiés. Ces mêmes mutants sont déficients en expression de DM, sans toutefois perdre les gènes  $DM\alpha\beta$ . Ceci suggérerait, encore une fois, une expression différentielle des classes II conventionnels et de DM [74]. DM semble aussi être exprimée chez plusieurs espèces [75-77].

#### 1.3.5. La localisation sub-cellulaire de HLA-DM

DM possède un signal de localisation lysosomal YTPL intracellulaire [78-81]. Si l'on mute ce tyrosine ou ce leucine, il y aura accumulation de DM à la surface cellulaire. Ce même double mutant co-exprimé avec la chaîne invariante se retrouve aux MIIC. Ceci semblerait démontrer que le motif de ciblage de HLA-DM n'est pas essentiel pour sa localisation. Cependant, la localisation de DM semble être indépendante de l'expression des molécules de CMH [82;83].

Dans les compartiments endosomaux, il y aurait cinq molécules de classe II pour une molécule de DM, en comparaison avec le total cellulaire qui rejoindrait 20 pour 1 [80;84;85]. HLA-DM serait donc une résidente permanente du système endosomal (MIIC) et une petite fraction de la molécule serait exprimée en surface, par fusion des MIIC [67;86]. DM serait aussi présente dans les compartiments précoces, en surface des

lymphocytes B et des cellules dendritiques immatures (10-15%). Ces molécules de DM engageraient des complexes avec des molécules de classe II vides, d'où le rôle possible de DM dans les compartiments de recyclage [87].

Un mutant dominant négatif de clathrine suggère que DM et les complexes CMH/Ii voyagent du Trans-Golgi dans des compartiments distincts [88]. De plus, des études de microscopie électronique ont démontré que la liaison entre DR et DM n'est pas nécessaire pour la localisation des deux molécules [89].

### **1.3.6. La relâche de CLIP**

L'étude de l'homologie entre HLA-DM et les molécules de classe II classiques a permis de formuler l'hypothèse selon laquelle DM pourrait lier CLIP et ainsi permettre la relâche de celui-ci<sup>13</sup>. Puis une autre hypothèse a émergé selon laquelle DM pourrait plutôt transporter des peptides et les amener directement à la niche peptidique des molécules de classe II<sup>14</sup> [67;69]. La structure cristalline de DM a permis d'éliminer ces hypothèses. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, DM ne possède pas de niche peptidique et ne peut donc pas lier de peptides. Il semble aussi qu'une liaison peptidique à l'extérieur de la niche présumée de DM soit peu probable (Figure 1.9, p.30) [61;75;90].

Pour parvenir à découvrir les mécanismes d'action de DM, des analyses biochimiques ont été requises. DM semble augmenter indirectement le chargement peptidique en accélérant la dissociation de CLIP, d'une façon

---

<sup>13</sup> Hypothèse du « *CLIP sink* » d'après Trowsdale et Peterson.

<sup>14</sup> Hypothèse du « *peptide shuttle* » d'après Trowsdale et Peterson.

dose-dépendante. De plus, DM augmente directement le chargement des peptides antigéniques sur les molécules de classe II [84;91;92].

### **1.3.7. La dépendance allélique de la relâche de CLIP**

La lignée T2 transfectée avec les molécules DR3, DR4 ou DR11 possède un certain nombre de peptides endogènes (autres que CLIP) à la surface cellulaire [93]. Il semble donc que l'on puisse charger des peptides en l'absence de DM. Des recherches ont démontré que CLIP peut être relâché et échangé pour d'autres peptides dans le contexte de certains allèles et ce même en l'absence de DM. En effet, certains allèles de classe II ont une affinité réduite pour CLIP, c'est le cas de DR3, DR4, DR5 (humains), A<sup>d</sup> et de A<sup>k</sup> (murins). Ceci peut être attribuable à la partie N-terminale de CLIP qui permet sa dissociation [40;44;79;90;94-97].

D'une façon mécanistique, la partie C-terminale (résidus 90-104) de CLIP, riche en prolines et en lysines, semble compétitionner avec les autres peptides pour la liaison au dimère de classe II [45;98]. La portion N-terminale (résidus 81-89) préviendrait une interaction rigide des résidus de CLIP (90-104) avec les poches de la niche peptidique [45;99]. Cette même portion accélère donc la relâche de CLIP à faible pH. Cette fraction semble interagir de façon transitoire avec un site à l'extérieur de la niche peptidique, ce qui contribue à augmenter le niveau de dissociation [99;100]. Cette interaction n'a cependant pas pu être résolue sur le cristal de DR3/CLIP [38].

Cette découverte pourrait expliquer la différence de susceptibilité à DM selon les différents allèles [101]. Par exemple, DR1 est plus dépendante de DM que DR4, puisque DR1 possède une affinité plus grande pour CLIP.

D'une façon évolutive, DM était nécessaire pour permettre à chacun des allèles de maîtriser la dissociation de CLIP.

### 1.3.8. La relâche de peptides instables

Certaines études ont démontré que H2-M influence le répertoire de peptides, même lorsque la dissociation de CLIP n'est pas limitante pour la présentation. De plus, des analyses ont démontré que la présentation de plusieurs antigènes est dépendante de DM, même lorsque l'allèle de classe II forme des complexes instables avec CLIP<sup>15</sup> ou que II est absent [102-104]. Ces résultats démontrent le potentiel de DM d'éditer certains peptides autres que CLIP *in vivo*.

Les recherches pour élucider le mode de fonctionnement de DM ont permis de découvrir que cette molécule n'affectait pas seulement la dissociation de CLIP. La sensibilité ou la résistance face à la catalyse par DM semble attribuable à certaines caractéristiques. Tout d'abord, la stabilité intrinsèque semble importante. De récentes études ont dévoilé l'importance du résidu en position P1 de la niche peptidique. L'utilisation d'un mutant de classe II<sup>16</sup> en position P1, qui rend la molécule en conformation ouverte, semble faciliter l'association avec DM en comparaison avec des peptides stables [105;106]. La poche P1 semblerait donc être la cible préférentielle de DM. De plus, les poches P4 et P6 de la niche peptidique du classe II semblent aussi importantes (Figure 1.4, p.22) [107].

---

<sup>15</sup> Mesuré par la résistance au SDS. En exemple, les complexes DR1/CLIP sont résistants au SDS. Au contraire, les complexes DR4/CLIP sont plus sensibles et se désassemblent dans ce détergent.

<sup>16</sup> Le mutant DR1<sub>βG86Y</sub> est toujours en forme réceptive ou ouverte et permet l'association avec HLA-DM. La tyrosine remplit partiellement la poche P1 et empêche le classe II de former une liaison peptidique stable.

Deuxièmement, le nombre d'acides aminés en N-terminal semble aussi très important. Des analyses des peptides associés aux molécules de CMHII dans des cellules DM positives ont révélé que la plupart des peptides étaient plus longs que 11 résidus [10;48;58;94;96;107;108].

Il s'avérerait aussi que la présence de résidus prolines ou glycines, des acides aminés déstabilisants, contribue à rendre les peptides sensibles à l'action de DM. Ces résidus bouleversent la structure secondaire du squelette peptidique. Par exemple, un peptide sensible à l'action de DM peut être rendu résistant en substituant ses quatre glycines liant les poches peptidiques par des alanines<sup>17</sup> [92;108]. Il y aurait donc une corrélation importante entre le taux de dissociation, la stabilité cinétique du complexe  $\alpha\beta$ /peptide et la susceptibilité d'un peptide à l'action de DM [96;108].

DM pourrait donc lier les molécules de classe II avec des peptides instables, mais aurait moins d'affinité pour les molécules avec des peptides stables. Il a été spécialement démontré, de façon cinétique, que les complexes DR/peptide avec des demi-vies de moins de 20 heures étaient sensibles à l'action de DM. En comparaison, les complexes qui atteignaient une demi-vie plus grande que 100 heures étaient résistants [94;96;109]. Ceci contribuerait donc à la persistance des complexes CMH/peptide et à l'augmentation de la concentration de ces mêmes complexes en surface cellulaire.

---

<sup>17</sup> Peptide du collagène de type II.

### 1.3.9. L'activité catalytique de HLA-DM sur les CMHII

HLA-DM augmente subséquemment l'association des molécules de classe II avec les peptides antigéniques, par l'augmentation de la dissociation de CLIP et des peptides instables. Il a été démontré *in vitro* que DM catalyse le chargement sur DR2/CLIP. Si l'on ajoute des complexes DR3/CLIP dans l'essai, DM compétitionnera pour les deux différents complexes de classe II. Si au contraire, des complexes DR3/peptide stable sont ajoutés, il n'y aura que très peu de compétition, car ces complexes sont de mauvais substrats de DM [94].

HLA-DM diminue aussi la demi-vie de la liaison peptidique. En effet, comme nous l'avons mentionné auparavant, le temps nécessaire pour lier un peptide est dix fois plus grand *in vitro*. Selon des études de cinétique, il a été démontré qu'une molécule de DM pouvait catalyser le chargement sur plus de 20 molécules de CMHII [84]. Il a donc été confirmé que la réaction suit une cinétique Michaelis-Menten et que DM peut catalyser environ 3 à 12 CMHII par minute. Comme souligné auparavant, ce ratio dépend des allèles, de la stabilité des hétérodimères  $\alpha\beta$  et de la disponibilité de différents ligands peptidiques [94].

### 1.3.10. L'implication des ponts hydrogènes

Les liaisons hydrogènes permettent l'orientation du peptide. La conformation se stabilise par l'ensemble des liaisons hydrogènes formées. La perte d'une liaison de ce type conduit à une diminution de la liaison peptidique en diminuant la probabilité d'établir une liaison forte des ancrés. La formation de liaisons hydrogènes normales est critique pour la stabilité peptidique. En effet, une seule mutation en  $\beta 81$  ou en  $\beta 82$  de DR fait en sorte que les molécules de classe II demeurent dans le réticulum

endoplasmique. DM pourrait donc agir en stabilisant un intermédiaire où une ou plusieurs liaisons hydrogènes seraient brisées [110;111].

Durant l'interaction entre DM et une molécule de classe II, les peptides résistants à l'action de DM maintiendraient un niveau d'énergie de liaison suffisant, permettant au complexe de persister. Au contraire, dans le cas de peptides avec une énergie insuffisante, il y aurait principalement un manque d'énergie de liaison et finalement il y aurait dissociation du complexe CMH/peptide. DM pourrait donc contrôler le réseau de liaisons hydrogènes.

#### **1.3.11. L'action de HLA-DM sur la voie de recyclage**

Comme nous l'avons mentionné auparavant, DM pourrait être présente en surface cellulaire des lymphocytes B et des cellules dendritiques [87]. De plus, DM semblerait pouvoir agir faiblement à pH neutre. En effet, des études de fractionnement cellulaire sur des lymphocytes B ont démontré une fraction de complexes DM/DR dans la membrane et les compartiments endosomaux précoces [112].

Nous pouvons donc concevoir que certains épitopes sensibles aux protéases, qui seraient détruits durant la protéolyse dans les lysosomes, pourraient maintenant être présentés dans des compartiments plus précoces.

Le chargement peptidique d'antigènes dans les compartiments de recyclage a toujours été considéré comme une voie mineure de présentation antigénique. Cette route secondaire est indépendante des molécules de classe II nouvellement synthétisées. Certains peptides ont été démontrés comme utilisant cette voie : entre autres des peptides dérivés de

l'hémagglutinine du virus Influenza (HA) ou de la myéline (MBP) [113-115]. Les cellules dendritiques sont un exemple de CPA qui utilisent la voie de recyclage. Les cellules dendritiques du sang périphérique possèdent des ectoprotéases à leur surface qui contribueraient au traitement extracellulaire des antigènes [116]. En conséquence, certains antigènes pourraient être capturés dans le milieu et être présentés directement par les molécules de classe II. La présence de DM dans cet exemple serait essentielle pour prévenir la présentation de peptides de faible affinité.

### **1.3.12. HLA-DM : Un chaperon<sup>18</sup>**

Après la dissociation de CLIP ou d'un peptide instable, la niche peptidique sera vide pour une période indéterminée. Cette période dépendra de la réserve peptidique, qui varie selon le type cellulaire, l'état d'activation et les compartiments du système endosomal. Sachant la fonction catalytique de DM et son interaction transitoire avec les molécules de classe II, il était surprenant d'observer des complexes de demi-vie élevée entre DM et DR dans les endosomes [86].

Suite à la dissociation de CLIP ou d'un peptide instable et lors du chargement peptidique, les classes II doivent passer par un intermédiaire conformationnel, où leur niche peptidique sera vide. Les classes II sans peptide sont exposés à l'agrégation et au désassemblage à pH acide [90;117-119]. Ceci est causé par l'exposition d'une surface hydrophobique de la niche peptidique et d'un changement structural qui sera suivi par la dénaturation de la molécule [119-121]. Un ligand occupant la niche peptidique, comme CLIP ou Ii, est donc essentiel pour la structure, le

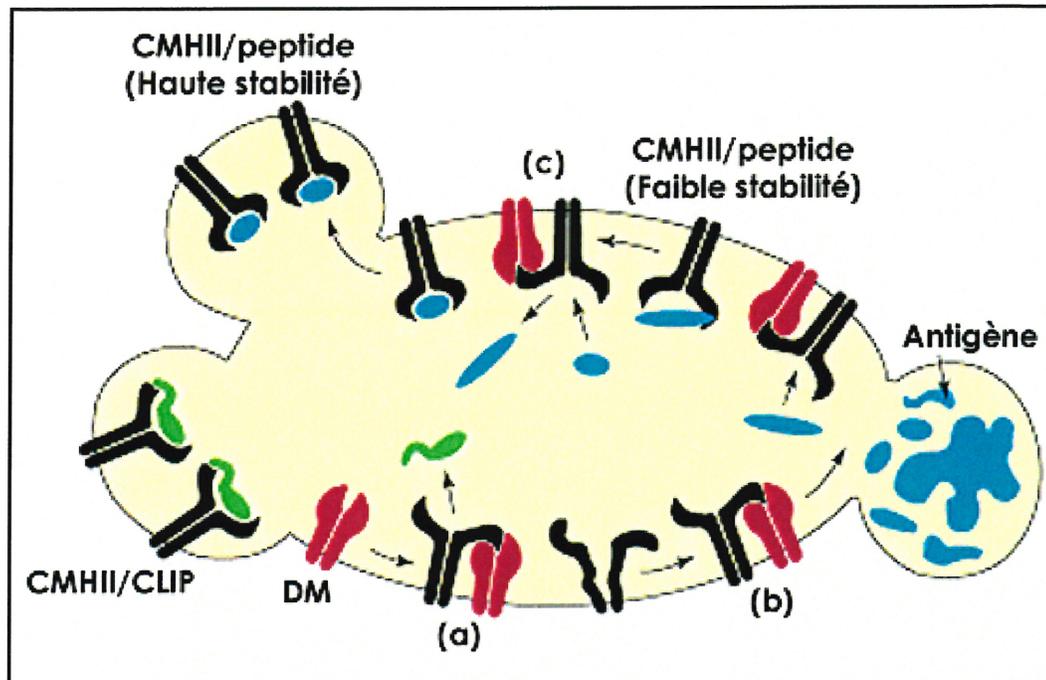
---

<sup>18</sup> Un chaperon est défini comme une molécule qui prévient les interactions impropres, qui médie l'assemblage et qui ne constitue pas une partie de la structure finale.

fonctionnement et la protection des classes II dans l'environnement inhospitalier des lysosomes.

En résumé, DM possède la capacité de lier les classes II vides en stabilisant la niche sans peptide et peut donc prévenir l'agrégation à pH acide [90;109;122]. DM semble avoir notamment une affinité plus élevée pour les conformations de classe II ouvertes [90;94;96]. Cette action de DM contribue ainsi à rendre le classe II réceptif au chargement peptidique, tout en maintenant sa structure. DM stabilise donc un intermédiaire de classe II et facilite l'assemblage avec la troisième sous-unité; le peptide. DM semblerait ne pas se dissocier des molécules de classe II tant qu'un peptide approprié et stable ne se soit lié à la niche (Figure 1.10, p.40) [96;123].

La quantité stœchiométrique de DM nécessaire pour stabiliser les CMHII n'est pas connue. Des études ont démontré qu'*in vitro* des quantités égales étaient requises. Cependant, *in vivo*, les molécules DR et DM sont présentes à des densités plus élevées dans les organelles endosomales et lysosomales. Nous pouvons aussi concevoir que la membrane présente dans ces essais joue un rôle prédominant dans l'alignement des deux molécules et par le fait même augmente l'activité de DM [124;125].



**Figure 1.10.** L'activité chaperonne de HLA-DM (DM) dans les compartiments endosomaux/lysosomaux. (a) DM (rouge) interagit avec les complexes CMH II/CLIP et permet la dissociation de CLIP (vert). (b) DM stabilise les classes II vides dans les compartiments endosomaux jusqu'à ce qu'un peptide stable s'y lie (bleu). (c) Lorsqu'un ligand de forte affinité s'est lié à la niche de la molécule de classe II, DM se dissocie. Les peptides de faible affinité ne permettent pas la dissociation de DM. L'action de DM permet donc la formation de molécules de classe II qui auront une demie-vie élevée et qui pourront être transportées à la surface cellulaire (Adapté de Vogt et al, TIBS, 1999) [126].

### 1.3.13. Les fonctions de HLA-DM *in vivo*

Le *knock-out* de H2-M présente une expression normale de CMHII à la surface cellulaire. Cependant, comme DM est responsable de la dissociation de CLIP, ces souris présentent principalement ce peptide endogène en surface des leurs CPA.

Ce modèle animal est aussi déficient dans la présentation de protéines intactes et exhibe une diminution de présentation de peptides exogènes. Ces expériences ont aussi démontré une augmentation de la sélection positive, par une diminution des lymphocytes CD4<sup>+</sup> de 3 à 4 fois. De plus, ces souris ont illustré une diminution de la sélection négative, par un manque de tolérance au niveau des complexes CMH/peptide endogènes exprimés [127-129].

Le *knock-out* H2-M semble être compétent pour la production d'immunoglobuline dépendante des lymphocytes T. Cependant, la qualité de la production<sup>19</sup> est diminuée. Toutefois, les souris déficientes survivent à une infection du virus chorioméningite lymphocytaire (LCMV) et du virus de la stomatite vésiculaire (SVV), ce qui semblerait démontrer la présence d'un mécanisme compensatoire [102].

D'autres études sur la fonction de DM ont été réalisées sur des souris H2-M<sup>-/-</sup>Ii<sup>-/-</sup>. Ces dernières présentent un défaut de maturation des classes II et la présentation de plusieurs peptides est diminuée. Le phénotype des souris Ii<sup>-/-</sup> et des souris H2-M<sup>-/-</sup>Ii<sup>-/-</sup> est différent, ce qui démontre encore une fois que la dissociation de CLIP n'est pas la seule fonction de DM [102;130].

Le modèle H2-M<sup>-/-</sup>Ii<sup>-/-</sup> est aussi sensible à une infection par *Leishmania major*, en comparaison avec le mutant Ii<sup>-/-</sup> qui est résistant. Ces conséquences sont provoquées par un manque de correction de DM, par un manque de traitement intracellulaire du parasite ou par une diminution de la sélection thymique des lymphocytes T appropriés. Ces résultats illustrent

---

<sup>19</sup> La qualité de la production est définie par la cinétique, le titre et la maturation d'affinité.

que DM est essentielle, indépendamment de la dissociation de CLIP, pour maintenir l'immunité durant les infections [131].

## **1.4. LA MOLÉCULE HLA-DO**

### **1.4.1. La molécule non-classique HLA-DO**

HLA-DO et son homologue murin H2-O sont des hétérodimères fonctionnels peu polymorphiques [132-135]. DO est une autre molécule non-classique, identifiée par hybridation croisée dans les années 80, qui comporte beaucoup de similitudes avec DP, DQ et DR [133;134;136]. Son expression semble être restreinte aux lymphocytes B, aux cellules dendritiques et aux cellules présentatrices d'antigènes de l'épithélium médullaire thymique [137]. HLA-DO possède deux chaînes, tout comme les molécules de classe II classiques et sa transcription semble aussi partiellement permise grâce à CIITA [138].

HLA-DM dirige HLA-DO aux lysosomes et prévient sa dégradation dans le réticulum endoplasmique [139]. Cependant, DO contiendrait aussi deux motifs de ciblage potentiels aux endosomes [140;141]. Certains chercheurs ont émis l'hypothèse selon laquelle les complexes DO/DM pourraient circuler vers différents compartiments que la molécule DM seule.

### 1.4.2. Les fonctions de HLA-DO

Les premières approches ont démontré que DO était un régulateur négatif de DM<sup>20</sup> [142;143]. L'activité de DO semble dépendante de son ratio. Si le ratio de DO/DM est plus petit que 1; le niveau de CLIP est alors au niveau de *background*, alors que si le ratio devient plus grand que 1 : le niveau de classe II/CLIP augmente [123].

Dans le *knock-out* de H2-O, le ratio de CLIP demeure pourtant inchangé à la surface cellulaire. Toutefois, ces études ont permis de noter un changement au niveau du répertoire peptidique de surface [144-146]. Par exemple, la présentation d'un peptide de *Mycobacterium tuberculosis* Hsp65 est diminuée lorsque la cellule présentatrice d'antigènes surexprime DO, en comparaison avec les mêmes CPA sans DO, où le peptide est présenté adéquatement aux lymphocytes T [143].

L'action de DO, tout comme celle de DM, semble être dépendante du pH, sa régulation augmentant à un pH plus élevé que 5 (6-6.5) (endosomes précoces) [123;144;146]. DO influencerait indirectement la spécificité de la relâche des peptides par DM en limitant l'intervalle de pH où DM est pleinement actif en se liant directement à celui-ci. À faible pH, les complexes DM/DO seraient aussi actifs que DM seule.

DO serait déterminante pour la présentation des antigènes issus de l'internalisation spécifique par les BCR<sup>21</sup> des lymphocytes B. Les Ig membranaires internalisées sont plus résistantes à la dégradation et ne parviennent pas à être protéolysées dans les endosomes précoces. DO inhiberait donc la présentation moins spécifique des antigènes entrés par

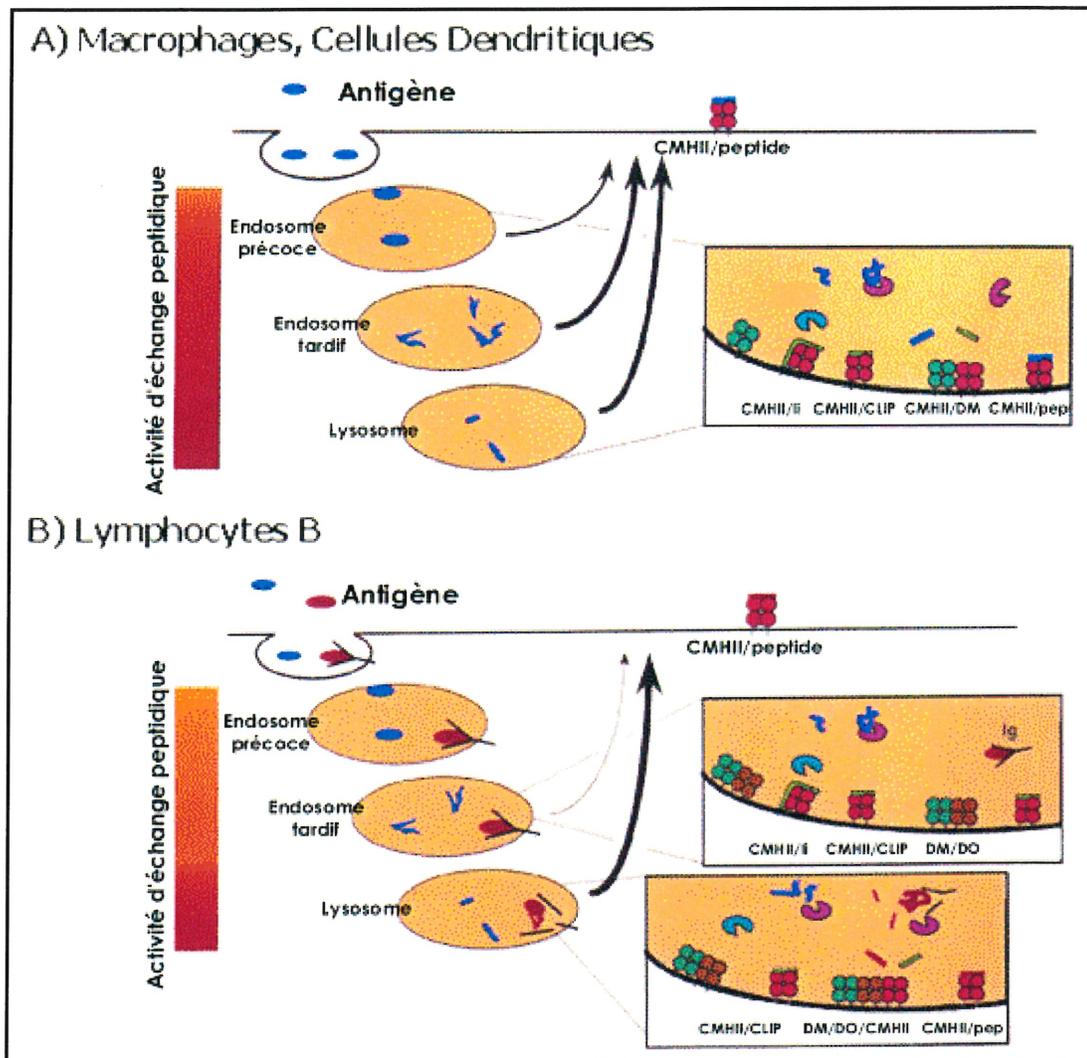
---

<sup>20</sup> Une surexpression de DO dans les cellules MelJuSo (mélanome humain) résulte en une augmentation des complexes DR3/CLIP.

pinocytose (phase fluide). DO servirait subséquemment à promouvoir la présentation antigénique des antigènes internalisés spécifiquement par les BCR dans les endosomes plus tardifs. En sommes, DO pourrait augmenter la spécificité de la présentation antigénique (Figure 1.11, p.44) [144].

---

<sup>21</sup> BCR abréviation de *B cell Receptor* (Récepteur des lymphocytes B).



**Figure 1.11. Modèle de présentation antigénique entre différentes CPA, selon la présence ou l'absence de HLA-DO. Les antigènes internalisés cheminent dans les voies endosomales, vers les endosomes précoces, les endosomes tardifs, puis vers les lysosomes et deviennent dénaturés et dégradés. (A) Les antigènes issus de la pinocytose sont protéolysés et générés dans les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes. En absence de DO, comme dans les cellules dendritiques et les macrophages, l'activité catalytique de DM est relativement élevée tout au long de la voie endosomale (Indiqué par la barre colorée de gauche). DM peut donc faciliter la dissociation de CLIP et l'acquisition de peptides stables qui seront acheminés en complexes avec les molécules de classe II en surface cellulaire (CMHII/peptide). (B) L'internalisation des antigènes par les lymphocytes B s'effectue par pinocytose et par liaison par des récepteurs mIg. Les peptides générés dans les endosomes se lient faiblement aux molécules de classe II, puisque DM est faiblement active étant liée à DO. La dissociation des antigènes des mIg est favorisée par un environnement hautement acide et protéolytique des lysosomes. Dans ces compartiments, DM peut alors agir, puisque la régulation négative de DM est faible à pH acide (Adapté de Alfonso et al., Annual Review Immunology, 2000) [147].**

### **1.4.3. HLA-DO: Un co-chaperon**

HLA-DO serait aussi considérée comme un co-chaperon. Certains types de classe II vides, comme DR1 et DR4, seraient régulés plus facilement par DM/DO que par DM seule. Si DO augmente la stabilité de l'interaction entre DR et DM, chaque cycle catalytique de DM pourrait être prolongé. Il semblerait aussi que la sélection peptidique soit plus restreinte par les complexes DM/DO que par DM seule. L'activité de co-chaperon de DO pourrait être nécessaire dans les compartiments où la concentration de DM est faible ou dans les cas de variants alléliques qui ont une faible affinité pour DM [123].

## **1.5. L'IMPLICATION DE HLA-DM ET DE HLA-DO DANS LA PATHOLOGIE**

### **1.5.1. L'implication de HLA-DM dans l'autoimmunité**

L'expression de DM ou son activité pourrait influencer l'initiation ou la progression des maladies autoimmunes. En effet, un polymorphisme ou une expression moindre de DM pourrait conduire à la présentation de peptides de plus faible affinité, ce qui conduirait à activer des lymphocytes par certains peptides normalement instables. Certaines études de polymorphismes des gènes de  $DM\alpha$ , de  $DM\beta$  et de leurs promoteurs ont été réalisées pour expliquer certaines maladies autoimmunes. Cependant, aucun lien avec l'association à l'arthrite rhumatoïde n'a été démontré [148-153]. Cependant, certains allèles de  $DM\alpha$  semblent prédisposer à l'IDDM<sup>22</sup> [154].

---

<sup>22</sup> IDDM abréviation de *Insulin-Dependent Diabetes Mellitus* (Diabète de type I).

Par exemple, dans le contexte de la pathologie de la sclérose en plaques, le peptide de MBP (87-99) peut stimuler des CD4<sup>+</sup> autoréactifs dans le contexte de DR1, DR2 ou DR4. Certains peptides immunodominants comme MBP (87-99) se sont révélés sensibles à l'action de DM dans le contexte de DR1 ou de DR4 et devraient donc être éliminés par la correction de HLA-DM. Néanmoins, il a été démontré avec des lymphocytes B, que MBP (87-99) possédait la capacité d'activer des lymphocytes T autoréactifs [92]. Les APC présentant les peptides de MBP pourraient diminuer l'activité, l'expression ou l'accès de DM sur DR. De plus, La liaison de MBP sur DR pourrait être incompatible avec la liaison de DM. Ce modèle pourrait aussi être applicable à d'autres maladies autoimmunes, où certains épitopes sont sensibles à l'action de DM [155].

Paradoxalement, il semble que ce ne soit pas toujours le cas. En exemple, un épitope de la glycoprotéine 39 du cartilage humain est critique pour la réponse des lymphocytes T dans l'arthrite rhumatoïde. DM semble primordiale pour la présentation de cet épitope aux CD4<sup>+</sup> autoréactifs [156].

### **1.5.2. L'implication de HLA-DM et de HLA-DO dans la sélection thymique**

Nous pourrions concevoir que si la quantité de DM dans les cellules thymiques est grande, seuls les peptides de haute affinité seront présentés et moins de lymphocytes T seront déléétés lors de la sélection négative. Subséquemment, des lymphocytes T en périphérie pourront être activés par des cellules présentatrices d'antigènes exprimant peu de DM.

De plus, DM est détectée dans les fractions corticales (cTEC<sup>23</sup>) et médullaires (mTEC<sup>24</sup>) du thymus, alors que HLA-DO n'est présente que dans la fraction thymique médullaire [137]. Les peptides présentés dans les tranches cTEC et mTEC pourraient être différents, par la différence en expression de DO.

Les mTEC présenteraient préférentiellement les peptides provenant des lysosomes. Dans ces fractions, DM nécessite la présence de DO, qui agira en co-chaperon. Les complexes DM/DO influenceront la présentation antigénique en formant un répertoire de peptides très stable. Les cTEC permettraient un chargement de peptides dans les compartiments plus précoces [137;157;158]. Il y aurait donc présentation d'un plus grand répertoire, puisque HLA-DM serait moins active à pH neutre et sans DO.

La sélection négative s'effectue principalement dans la région médullaire thymique. Les lymphocytes T réagissant avec des peptides du soi seront rendus anergiques ou seront éliminés par l'abondance de peptides ou par la persistance des peptides sur les CPA. Il devient donc évident que le répertoire présent doit être le plus stable possible afin de bien éliminer les lymphocytes auto-réactifs, d'où l'importance de la présence de HLA-DM et de HLA-DO dans la fraction mTEC.

### **1.5.3. Le rôle de HLA-DM dans les cancers**

Une étude récente a démontré que certains cancers associés avec un bon pronostic étaient attribuables à l'expression de DM. Nous pouvons donc concevoir que dans certains cancers, la présence de HLA-DM favoriserait la présentation de peptides tumoraux [137;159;160].

---

<sup>23</sup> cTEC abréviation de cellules épithéliales thymiques corticales.

#### **1.5.4. L'implication de HLA-DM dans l'évasion immunitaire**

Le mécanisme ultime d'évasion immunitaire d'un pathogène intracellulaire ou d'un virus serait, outre la diminution d'expression des CMH de surface, d'agir au niveau de DM. En effet, en inhibant HLA-DM, une quantité moindre de peptides stables est présentée en surface cellulaire. De cette façon, les pathogènes peuvent survivre plus longtemps en prévenant une reconnaissance du système immunitaire. En exemple, la protéine US2 du cytomégalovirus (CMV) semble dégrader  $DM\alpha$ . Ce virus infecte principalement les monocytes, macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules sont d'une grande importance pour l'infection, la latence et la réactivation du virus. En dégradant  $DM\alpha$ , le virus prévient la reconnaissance par les lymphocytes  $CD4^+$  et peut se réactiver dans l'hôte [161]. Nous pouvons donc concevoir que d'autres pathogènes utilisent ces mécanismes d'évasion, notamment le HIV.

### **1.6. LES INTERACTIONS ENTRE LES MOLÉCULES DE CLASSE II**

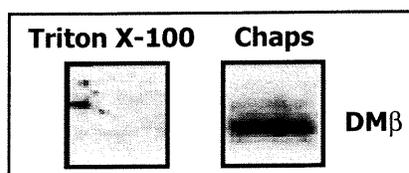
#### **1.6.1. La liaison directe entre HLA-DM et HLA-DR**

La liaison entre HLA-DM et les molécules de classe II a été démontrée en premier lieu par co-immunoprécipitation. Cette association semble être favorisée à un pH acide, correspondant à l'environnement lysosomal. De plus, l'interaction semble relativement faible, puisque les complexes sont isolés dans des détergents, comme la digitonine et le Chaps, mais rompus

---

<sup>24</sup> mTEC abréviation de cellules épithéliales thymiques médullaires.

par d'autres types de détergents plus forts, comme le Triton X-100 (Figure 1.12, p.48) [86;91;109].



**Figure 1.12. La Liaison entre HLA-DR et HLA-DM dans des cellules Raji<sup>25</sup>. Immunoblot représentant une immunoprécipitation de DR dans différents détergents (Triton X-100 et Chaps) et révélation de DM sur membrane (Anti-DM $\beta$ ).**

Il semble aussi que les CMH vides liés avec un peptide de faible affinité coprécipitent mieux que ceux liant un peptide de forte affinité [90;109]. De plus, il a été démontré que DM interagit largement avec DR/CLIP, mais faiblement avec des complexes isolés de cellules DM positives [94].

DM semblerait se lier à la portion N-terminale de la niche peptidique de DR. En effet, l'interaction de l'anticorps Cer-CLIP, qui lie la portion N-terminale de CLIP, semble bloquer la liaison de DM [84].

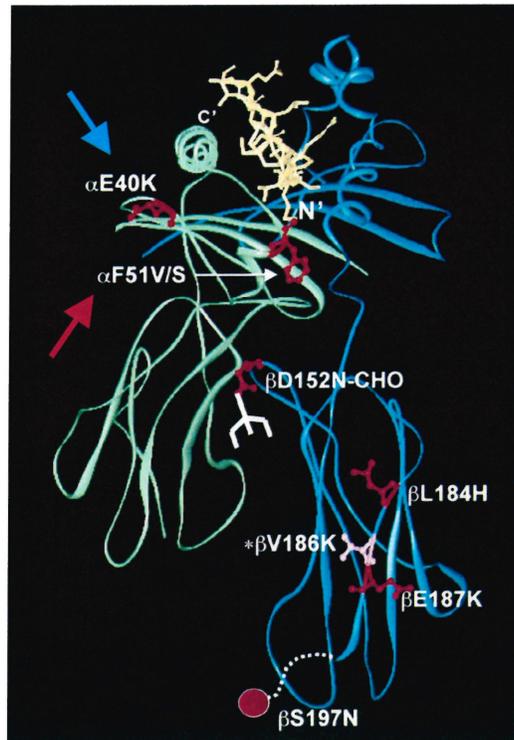
Le groupe de Mellins a isolé, en 1994, un mutant de DR ayant perdu la capacité de lier DM. Ce mutant possède un changement à la position  $\alpha 96$ <sup>26</sup>, qui crée un site de glycosylation en  $\alpha 94$ . Même si l'assemblage, le transport endosomal de DR et la protéolyse de la chaîne invariante demeurent inchangés, ce mutant perd sa capacité de dissocier CLIP, abolit l'interaction avec HLA-DM et forme des complexes moins stables en SDS. Ces résultats

<sup>25</sup> Lymphome de Burkitt humain.

<sup>26</sup> Une mutation en  $\alpha 96$  d'une proline qui devient une serine.

mettraient en évidence la possibilité d'une liaison parallèle entre HLA-DR et HLA-DM [86;92;162;163].

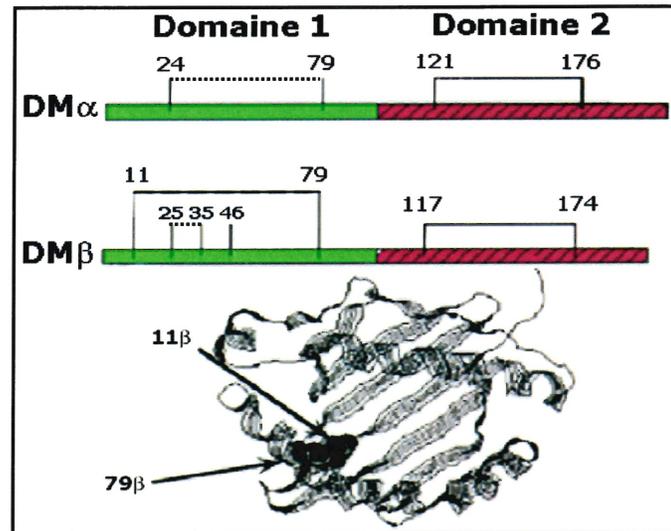
Plus récemment, le même groupe a effectué la mutagenèse aléatoire sur la molécule DR3. Après l'expression des ADNc mutés, ils ont isolé les cellules présentant CLIP en surface cellulaire. Ils ont donc été en mesure de déterminer un bon nombre de mutations affectant la liaison entre DM et DR. Les résidus pointés qui semblent les plus importants sont E40 et F51. Ces résidus, situés du côté N-terminal de la niche peptidique, semblent primordiaux pour l'activité de DM (Figure 1.13, p.50) [164].



**Figure 1.13. Détermination des sites importants sur la molécule DR3/CLIP pour l'association avec HLA-DM. Structure cristalline de HLA-DR3/CLIP; DR $\alpha$  est illustré en vert, DR $\beta$  en bleu et CLIP en jaune. Identifiés par mutagenèse aléatoire, les résidus  $\alpha$ E40 et  $\alpha$ F51 semblent primordiaux pour la dissociation de CLIP par HLA-DM et par le fait même importants pour l'interaction entre HLA-DR et HLA-DM. La flèche rouge pointe le résidu hydrophobe F51 et la flèche verte pointe le résidu chargé négativement E40 (Adapté de Doebele et al, *Immunity*, 2000)[164].**

En ce qui concerne les résidus de DM affectant la liaison avec les classes II, peu d'études à ce jour ont été publiées. Un mutant DM $\beta$ C79Y a été isolé. Ce dernier ne permettait pas la dissociation de CLIP des molécules de classe II, sortait faiblement du réticulum endoplasmique et était dégradé rapidement. Des études plus approfondies ont déterminé que cette molécule mutante ne formait pas d'hétérodimères. Le problème de présentation était donc relié à la mauvaise conformation de la molécule et non à une diminution de liaison

aux classes II [165]. En effet, le cristal a révélé que la cystéine mutée formait habituellement un pont disulfure avec le résidu DM $\beta$ C11 (Figure 1.14, p.51).



**Figure 1.14. Illustration de la distribution des résidus cystéines dans le domaine extracytoplasmique des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de HLA-DM. (Haut) Les lignes horizontales indiquent les liaisons disulfures différentes des autres molécules de la superfamille des immunoglobulines. Les lignes horizontales pointillées montrent les liaisons disulfures différentes avec les molécules du CMH. En vert sont indiqués les domaines 1 et en rouge les domaines 2. (Bas) Ponts disulfures formés entre  $\beta$ 11 et  $\beta$ 79 (Adapté de Busch et al., *Journal of Immunology*, 1998) [165].**

### 1.6.2. La liaison entre HLA-DM et HLA-DO

À ce jour, aucune étude concernant les sites de contact entre HLA-DM et HLA-DO n'est parue. Il y a encore discorde à savoir s'il y a formation d'un complexe tri-moléculaire entre DO, DM et DR ou si seule DM peut lier les deux molécules [123;166]. En fait, si la première hypothèse est vérifiée, nous pourrions croire qu'il y aurait deux sites d'interaction différents sur

HLA-DM. En comparaison, si un seul site de liaison est important, les deux molécules, CMHII et HLA-DO, seraient en compétition pour le même site. Toutefois, la liaison entre DM et DO semble différer de celle entre DM et DR. En effet, les complexes DM/DO semblent associés plus fortement, pouvant être isolés dans des détergents forts, comme le Triton X-100.

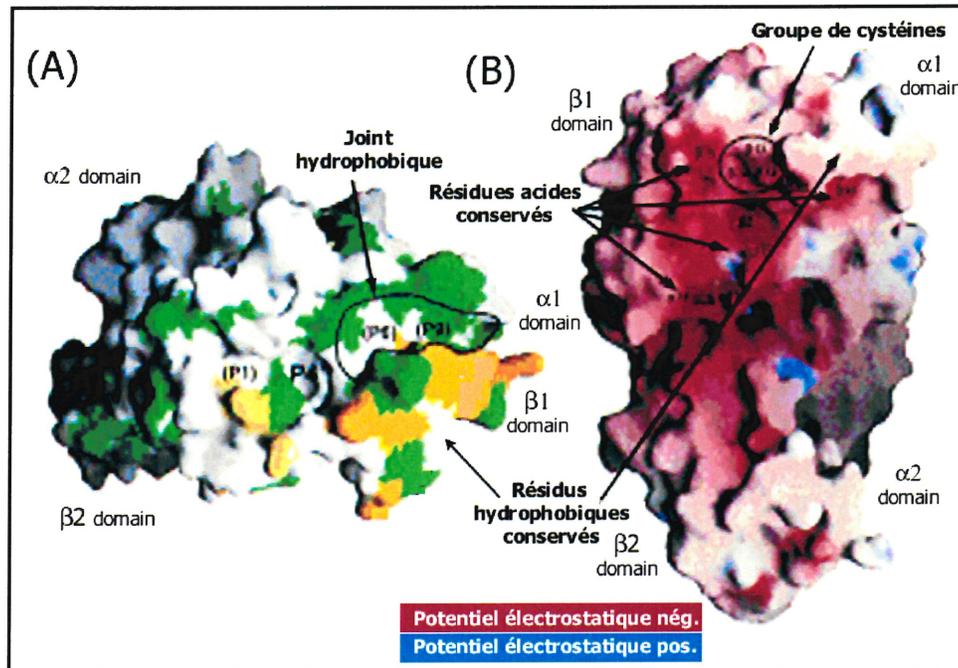
### **1.6.3. Les Hypothèses sur les sites fonctionnels de HLA-DM**

Les premières hypothèses du groupe de Fremont du modèle de l'interaction entre HLA-DR et HLA-DM, reposent sur le fait que les groupements acides de HLA-DM doivent être protonés pour pouvoir interagir avec les molécules de classe II à pH acide. Selon ce modèle, les charges acides exposées sur H2-M  $\alpha$ 36,  $\beta$ 8 et  $\beta$ 46<sup>27</sup> auraient un immense potentiel de liaison aux molécules de classe II (Figure 1.15, p.53)[61].

Enfin le groupe de Fremont mentionne aussi des poches hydrophobiques importantes à la surface de HLA-DM qui pourraient avoir une implication dans la fonction. C'est le cas de la poche P4, P6 et P9 sur DM, par analogie à la niche peptidique des classes II classiques. Le positionnement de ces régions favoriserait une interaction de DR vers le haut de la molécule (Figure 1.15, p.53) [61].

---

<sup>27</sup> Tous trois sont des résidus de type glutamate (E).



**Figure 1.15. Les modèles de liaison proposés par le groupe de Fremont. Le groupe de Fremont propose deux modèles de liaison, le premier impliquant des sites hydrophobes (A) et le deuxième impliquant des charges négatives (B) (Adapté de Fremont et al., Immunity, 1998) [61].**

Enfin, ce groupe mentionne aussi l'effet possible d'un résidu de type cystéine libre, en position 45 de H2-M $\beta$ , qui ne forme pas de pont disulfure<sup>28</sup> [61;62].

#### 1.6.4. L'hypothèse d'une interaction entre résidus hydrophobes

Des études antérieures semblaient établir que la nature de l'interaction entre HLA-DR et HLA-DM consistait en l'interaction de résidus hydrophobes. En effet, des études de liaison du colorant ANS (acide 8-anilino-1-naphthalenesulfonique) et de dichroïsme circulaire (CD) ont démontré que HLA-DR et HLA-DM subissaient un changement de conformation avec la

baisse de pH, ces changements affectant principalement des résidus hydrophobes exposés à pH acide [43;167-170]. Cette même étude, utilisant l'ANS, a aussi permis de déterminer que les résidus hydrophobes importants pour le changement de conformation sur HLA-DR et sur HLA-DM s'associaient entre eux à faible pH [168]. HLA-DO, qui possède une grande homologie de séquence avec les classes II classiques, semble aussi subir un changement de conformation avec la baisse de pH [144].

Une étude plus récente, du groupe de Mellins, a identifié les sites d'interaction de HLA-DR sur la molécule HLA-DM. Cette étude a mis en évidence plusieurs résidus importants pour l'interaction, dont un résidu hydrophobe de type phénylalanine (F51) (Figure 1.13, p.50) [164].

La structure cristalline de DM a permis d'illustrer deux résidus hydrophobes conservés et exposés. Nous verrons dans un prochain chapitre (article) l'effet de ces mutants W62A et W120A sur la liaison aux molécules de classe II et sur la liaison à HLA-DO [171].

---

<sup>28</sup> Ce résidu correspond à la position C46 de HLA-DM et sera analysé dans la discussion.

## **1.7. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL**

Dans la partie antérieure du travail, nous avons effectué une revue générale sur les fonctions et la régulation de HLA-DM. Notre travail ultérieur porte donc plus spécifiquement sur l'interaction entre les CMHII et DM. Nous analyserons donc différents résidus de DM pouvant être importants pour sa fonction et son interaction avec les molécules du CMH de classe II classiques. Nous étudierons différents résidus hydrophobes pouvant être impliqués dans l'interaction entre ces deux molécules. Puis, nous émettrons l'hypothèse selon laquelle des résidus chargés positivement et une cystéine libre pourraient être impliqués dans les fonctions de DM. Finalement, nous présenterons un modèle possible d'interaction, qui établira un lien avec notre analyse réalisée.

**CHAPITRE 2**  
**ARTICLE**

## **Functional Analysis of Tryptophans**

### **$\alpha$ 62 and $\beta$ 120 on HLA-DM**

Amélie Faubert<sup>1\*</sup>, Angela Samaan<sup>2 $\xi$</sup>  and Jacques Thibodeau<sup>\*+</sup>

Publié dans le Journal of Biological Chemistry ©

2002 January 25; 277 (4): 2750-5

#### **Running Title: DM-DR Interactions**

\* Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montréal, Québec, Canada.

$\xi$  Hôpital St-Louis, Paris, France.

Keywords: Antigen Processing, MHC class II, HLA-DM and HLA-DO.

---

<sup>1</sup> **Amélie Faubert a effectué toutes les constructions, les manipulations et la rédaction du manuscrit.**

<sup>2</sup> **Dr Samaan a contribué à l'article par la production d'un anticorps polyclonal de lapin anti-DM $\beta$ .**

## 2.1. SUMMARY

In the endocytic pathway of antigen presenting cells, HLA-DM catalyzes the exchange between CLIP and antigenic peptides onto MHC class II molecules. At low pH of lysosomal compartments, both HLA-DM and HLA-DR undergo conformational changes and it was recently postulated that two partially exposed tryptophans on HLA-DM might be involved in the interaction between the two molecules. In order to define contact regions on HLA-DM, we have conducted site-directed mutagenesis on those two hydrophobic residues. HLA-DM  $\alpha$ W62A,  $\beta$ W120A (DM<sub>W62A/W120A</sub>) double mutant was expressed in HLA-DR<sup>+</sup> HeLa cells expressing invariant chain and the activity of this DM molecule was assessed. Flow cytometry analysis of cell surface DR/CLIP complexes revealed that DM<sub>W62A/W120A</sub> removes CLIP as efficiently as its wild-type counterpart. DM<sub>W62A/W120A</sub> was found in the endocytic pathway by immunofluorescence and DM/DR complexes were immunoprecipitated from these cells at pH 5. Finally, mutations  $\alpha$ W62A and  $\beta$ W120A on HLA-DM did not affect the association with HLA-DO. The complex egresses the endoplasmic reticulum and accumulates in endocytic vesicles. Moreover, DO and DM<sub>W62A/W120A</sub> were co-immunoprecipitated at pH 7. We conclude that the  $\alpha$ 62 and  $\beta$ 120 tryptophan residues are not required for the activity of DM nor are they directly implicated in the interaction with DR or DO.

## 2.2. RÉSUMÉ

Dans les compartiments endosomaux/lysosomaux des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, HLA-DM catalyse l'échange entre CLIP et des peptides antigéniques sur les molécules du CMH de classe II. Au pH acide de ces compartiments, HLA-DR et HLA-DM subissent un changement conformationnel et l'hypothèse que deux tryptophanes partiellement exposés sur HLA-DM pourraient être impliqués dans l'interaction entre les deux molécules a été exposée. Afin de déterminer la région de contact entre les deux molécules, nous avons effectué une mutagenèse dirigée sur ces résidus hydrophobes. Le double mutant de HLA-DM aux positions  $\alpha$ W62A,  $\beta$ W120A ( $DM_{W62A/W120A}$ ) a été exprimé dans des cellules HeLa HLA-DR<sup>+</sup> exprimant la chaîne invariante. Des analyses de cytométrie en flux des complexes de surface DR/CLIP ont démontré que  $DM_{W62A/W120A}$  permet la dissociation de CLIP de façon aussi efficace que la molécule de type sauvage.  $DM_{W62A/W120A}$  a été trouvée dans les compartiments endosomaux par immunofluorescence et les complexes DM/DR ont été immunoprécipités de ces cellules à pH 5. Finalement, les mutations  $\alpha$ W62A et  $\beta$ W120A de HLA-DM n'affectent pas l'association avec HLA-DO. Les complexes sortent du réticulum endoplasmique et rejoignent les vésicules lysosomales. De plus, DO et  $DM_{W62A/W120A}$  ont été co-immunoprécipités à pH 7. Nous concluons que les résidus tryptophanes  $\alpha$ 62 et  $\beta$ 120 ne sont pas requis pour l'activité de DM et qu'ils ne sont pas impliqués directement dans l'interaction avec DR et DO.

## 2.3. INTRODUCTION

Major histocompatibility complex (MHC) class II molecules are primordial for activation of CD4+ T cells and for immunological response against pathogens (1). Three MHC II  $\alpha/\beta$  heterodimers associate with a trimer of invariant chain (Ii) to form a nanomeric complex in the endoplasmic reticulum (ER) (2). This association allows the proper folding and trafficking of the MHC II molecules (3-5). Gradual proteolysis of Ii occurs in the endocytic compartments by the sequential action of proteases including cathepsins (6). A residual peptide of Ii (CLIP) remains in the peptide groove of the class II molecule and stabilizes the heterodimer by preventing collapsing of the groove (7,8). For most allotypes, CLIP must be actively removed in order to allow binding of antigenic peptides. HLA-DM, a non-classical intracellular class II molecule, plays a central role in the efficiency of antigen presentation as it catalyzes CLIP release from HLA-DR and stabilizes the class II in a chaperone-like fashion (9-14). In fact, mice lacking the H2-Ma gene express a high level of surface class II that are loaded with CLIP (15-17).

The precise molecular mechanism of action of HLA-DM remains to be established. X-ray diffraction studies on HLA-DM crystals revealed a closed peptide-binding groove and an overall quaternary structure similar to classical class II molecules (18,19). Time-resolved fluorescence anisotropy and far-UV circular dichroism spectrum analysis using soluble HLA-DM revealed that its structure is quite rigid and that it is not subjected to gross pH-dependent conformational change. However, many other experiments by the same groups suggest that protonation in the endocytic pathway results in minor, reversible structural changes exposing hydrophobic regions of the DM heterodimer (20,21). For example, fluorescence spectroscopy

studies revealed that hydrophobic tryptophan residues are buried in native DM and would become more solvent-exposed at endosomal pH (20). Accordingly, Ullrich and collaborators used 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS), a fluorescent dye binding to hydrophobic protein patches, to demonstrate subtle pH-induced change in DM. Since the interaction of DM with DR reduces ANS binding to both molecules, it was postulated that the surface of contact comprises these pH-sensitive regions (21,22).

On the basis of these results, Wiley and collaborators proposed that two partially exposed tryptophans ( $\alpha$ 62,  $\beta$ 120), located on the same lateral surface of DM, could be critical for DR binding (19). The model predicts a major interaction between tryptophan  $\alpha$ 62 of DM and the protruding phenylalanine  $\alpha$ 51 of DR, resulting in the breakage of multiple hydrogen bonds at the end of the groove and in the release of unstably associated peptides. At least part of this model was recently confirmed when mutation of DR $\alpha$ F51 was shown to abolish the interaction with DM (23).

In order to confirm the possible interaction between DR $\alpha$ F51 and DM $\alpha$ W62, we have mutated the exposed tryptophan on HLA-DM and tested the ability of this mutant to release CLIP from HLA-DR. Our results show that this mutation on DM does not affect DR contact, CLIP release or the localization of the protein within the cell. Similar conclusions were drawn after mutating the second exposed tryptophan at position  $\beta$ 120. Finally, those amino acids substitutions on DM did not affect its interaction with HLA-DO, an intracellular non-classical class II molecule that binds to DM and regulates its activity.

## 2.4. EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 2.4.1. Plasmids

DM $\alpha$  cDNA was digested by *Ecl136II-ClaI* from pMCFR-PAC and subcloned into EcoRV-ClaI of pBluescript (pBS) (24). The DM $\beta$  cDNA has been described previously (25). DM $\alpha$  and DM $\beta$  cDNAs from pBluescript were subcloned successively on the same pBudCE4-A vector (as previously described) (25). The Ii p35 cDNA was obtained by mutagenesis of the second ATG codon of Ii (kindly provided by Rafick Sékaly) and subcloned in the *BamHI* site of SR $\alpha$ puro. Details will be provided elsewhere.

### 2.4.2. DM $\alpha$ and DM $\beta$ mutagenesis

Mutations into the DM $\alpha$  and DM $\beta$  cDNA sequences were introduced by PCR overlap extension (26). Briefly, 5' PCR products were generated from pBS DM $\alpha$  and pBS DM $\beta$  using mutagenic primers (DM $\alpha$ W62AEcoRI; 5'-CTG AGC CGC GTC AGC GAA TTC GGG-3', DM $\beta$ W120ANspI; 5'-GAA GCC CGC CAC ATA GCA TGC CAG CAT-3') as well as the universal (DM $\alpha$ ) or reverse (DM $\beta$ ) primers. The 3' PCR product was generated using the complementary mutagenic primers. The two overlapping PCR products were mixed, and a final PCR was performed using the flanking primers. Fragments were subsequently subcloned into the *PstI-SalI* sites of pBSDM $\alpha$  and *SalI-HindIII* of pBSDM $\beta$ , thereby replacing the wild-type fragment with the PCR product containing the appropriate mutation. The nucleotide sequence was confirmed by DNA sequencing using T7 polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Mutant cDNAs and wild-type were introduced into pBudCE4-A as *NotI-XhoI* (pBSDM $\alpha$ ) and *SalI-XbaI* (pBSDM $\beta$ ) fragments.

### 2.4.3. Antibodies

Monoclonal antibody (mAb) MaP.DM1 (IgG<sub>1</sub>) is directed against the luminal portion of HLA-DM (PharMingen International, Oakville, Canada). mAb L243 (IgG<sub>2a</sub>) binds a specific DR $\alpha$  conformational determinant (27). mAb BU45 (IgG<sub>1</sub>) binds the C-terminal part of the human invariant chain (CD74) (The Binding Site, Birmingham, England). mAb Cer-CLIP (IgG<sub>1</sub>) is directed against the N-terminal segment of CLIP (PharMingen International, Oakville, Canada) (24). Goat anti-mouse and goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor<sup>®</sup>488 were obtained from Molecular Probes (Eugene, Oregon). Biotinylated goat anti-mouse was from BIO/CAN scientific (Mississauga, CA) and Texas Red-coupled streptavidin from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). The anti-DO $\beta$  serum was produced in C<sub>3</sub>H mice (H-2<sup>k</sup>) by repeated intraperitoneal injections of DAP fibroblasts transfected with DR $\alpha$  and DR<sub>18</sub>/DO $\beta$  cDNAs (28). Rabbit antisera against the cytoplasmic tail of HLA-DO $\alpha$  or HLA-DM $\beta$  have been described previously (25). The CD107a-specific monoclonal antibody H4A3 (IgG<sub>1</sub>) reacts with the heavy glycosylated 100 KDa lysosomal-associated membrane protein (Lamp-1) (Developmental Studies Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa, IA)

### 2.4.4. Cell lines and transfections

HeLa DR1 (DR $\alpha$  + DR $\beta$  0101) cells were kindly provided by Dr. R. P. Sékaly. HeLa DO cells have already been described (25). In order to enrich for DO expressing cells, the population was treated with  $\gamma$  interferon (PharMingen International, Oakville, Canada) and sorted on magnetic bead for CLIP expression (Dynal ASA, Olso, Norway). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Burlington, Canada), 10% fetal bovine serum (Wisent, St.-Bruno, Canada), with appropriate selective agents (see

below). Stable transfections were done with Fugene6 (Roche Molecular Biochemicals, Mississauga, Canada) using  $1\mu\text{g}$  of DNA per  $10^5$  cells. Selective agents were added to a final concentration of  $500\mu\text{g/ml}$  G-418 (Life Technologies Inc, Burlington, Canada),  $400\mu\text{g/ml}$  puromycin (Sigma, Oakville, Canada),  $50\text{ units/ml}$  hygromycin (Cederlane Laboratories, Hornby, Canada) or  $100\mu\text{g/ml}$  Zeocin<sup>TM</sup> (Cayla, Toulouse, France).

#### **2.4.5. Flow Cytometry Analysis**

Intracellular staining was done as previously described (25). Briefly, saponin-treated cells were incubated with the appropriate primary antibody, then they were incubated with Goat anti-mouse IgG (H+L) coupled to Alexa Fluor<sup>®</sup>488. Cells were then analyzed by flow cytometry on a FACScalibur<sup>®</sup> (Becton Dickinson, Mississauga, Canada).

#### **2.4.6. Fluorescence Microscopy**

$10^4$  cells were plated on coverslips in 24-well plates and cultured for 3 days before staining (25). Cells were analyzed by fluorescence microscopy on a Zeiss axiochrome microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY). Photographs were taken with a Zeiss microscope camera MC 100 on Kodak elite chrome 400 films.

#### **2.4.7. Immunoprecipitations and Western Blotting**

Cells ( $4 \times 10^6$ ) were trypsinized, washed in PBS and lysed in 1% Triton X-100 at pH 7 or in Chaps 1% at pH 5 as described previously (29). After

centrifugation, supernatants were harvested and incubated with protein G coupled to CNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) and bound to the appropriate antibody (L243 mAb or mouse serum anti-DO $\beta$ ). Following washes in lysis buffer, samples were resuspended in non-reducing buffers and subjected to SDS-PAGE. After transfer to nylon membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), proteins were blotted with the rabbit anti-DO $\alpha$  or anti-DM $\beta$  sera. Secondary antibody (peroxidase-coupled goat anti-rabbit; BIO/CAN Scientific, Ontario, Canada) was used at 1:1000 dilution for 2 h and the signal was detected using ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

## 2.5. RESULTS

The crystal structure of DM reveals two partially exposed tryptophan residues that are thought to interact with HLA-DR and to participate in CLIP removal (19). Tryptophans  $\alpha$ 62 and  $\beta$ 120 are located on the same lateral face of HLA-DM in the  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 2 domains respectively (Fig. 2.1). These amino acids are highly conserved throughout evolution, emphasizing their potential importance.

In an effort to define the binding site for HLA-DR and to gain insights into the mechanism of action of HLA-DM, we mutated those two bulky aromatic tryptophans to small alanines and tested *in vivo* the ability of mutant proteins to remove CLIP from HLA-DR. Various combinations of mutated and wild-type DM  $\alpha\beta$  cDNAs were transfected in HeLa cells expressing DR1 and Ii. DR1 is known to be dependant on DM for the release of CLIP at acidic pH (30). We obtained four stable cell lines: DR1 Ii DM, DR1 Ii DM<sub>W62A</sub>, DR1 Ii DM<sub>W120A</sub> and DR1 Ii DM<sub>W62A/W120A</sub>. Expression of DR was monitored at the cell surface while DM and Ii were analyzed in permeabilized cells. As measured by flow cytometry, all cell lines express high levels of the various transfected molecules (Fig. 2.2). The proper folding and intracellular sorting of DM was assessed by immunofluorescence microscopy. Figure 2.3 shows that wild-type HLA-DM (panel B) accumulates in intracellular vesicles that are also positive for the lysosomal marker Lamp-1 (panel G). A tyrosine-based motif on the cytoplasmic tail of DM $\beta$  is responsible for its accumulation in endocytic compartments (31-33). The three mutated forms of DM were also found in peripheral vesicles (Fig. 2.3; C-E) and co-localized with Lamp-1 (Fig. 2.3; H-J). Control cells lacking DM showed a weak background using the DM-specific antibody but definite

Lamp-1 positive compartments (Fig. 2.3; A, F and arrows). Together with the fact that the MaP.DM1 conformational antibody efficiently recognizes the DM mutants, these results show that the overall structure of DM is not affected by replacement of tryptophans  $\alpha 62$  and  $\beta 120$ .

The activity of these mutant forms of DM was verified by monitoring the levels of DR/CLIP complexes at the cell surface of transfected cells. As demonstrated by many groups, introduction of HLA-DM in deficient cell lines favors the intracellular exchange of CLIP for more stable peptides (24,34,35). Consequently, CLIP expression is low at the surface of DM<sup>+</sup> cells. The cell surface expression of CLIP was measured using the Cer-CLIP monoclonal antibody that is specific for the N-terminus of CLIP bound to class II molecules and which does not recognize the intact invariant chain (24). As shown in figure 2.4A, control DM<sup>-</sup> cells (HeLa DR1 Ii) express high levels of DR/CLIP complexes at their surface. On the other hand, cells expressing wild-type or mutant forms of DM do not express significant levels of CLIP (Fig. 2.4; B-E). These results suggest that DR/Ii complexes are sorted to the endocytic pathway where Ii is degraded until a last fragment CLIP, is actively removed from the peptide binding groove by wild-type or mutant forms of HLA-DM. To confirm the proper interaction between the DM mutants and DR, co-immunoprecipitations were carried out at acidic pH in the CHAPS detergent (36). Figure 2.5 shows that DM can be co-immunoprecipitated by the DR-specific antibody only in cells expressing both molecules (Fig. 2.5, left three lanes). Also, the three mutant forms of DM could all be efficiently co-immunoprecipitated with HLA-DR (Fig. 2.5). The stronger DM $\beta$  signal obtained by western blotting on the HeLa DR1 Ii DM<sub>W62A/W120A</sub> samples most probably reflects the higher level of HLA-DR expression on these cells (Mean fluorescence value=789) as compared to

the other DM<sup>+</sup> transfectants (Mean fluorescence values=248-374) (Fig. 2.2). Taken together these results show that the mutations  $\alpha$ W62A and  $\beta$ W120A do not affect the folding, sorting and activity of HLA-DM, nor its ability to interact strongly with HLA-DR.

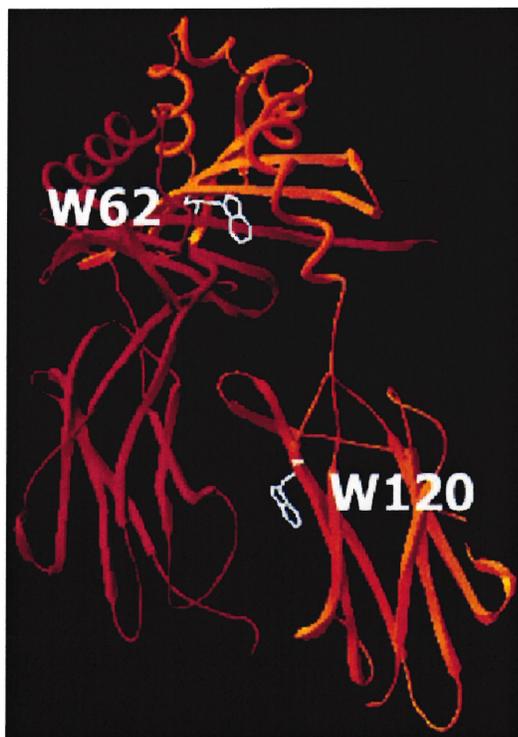
Although these tryptophan residues are not directly involved in the binding to HLA-DR, they might very well be crucial for the binding to HLA-DO. The latter is mostly expressed in B cells and is a non-classical class II molecule that modulates the activity of DM (37-39). The mode of action of DO is not determined but it clearly affects the peptidic repertoire when present in physiological amounts in an APC (40-42).

In order to further characterize the DO-DM contact regions, wild-type and double mutant (DM<sub>W62A/W120A</sub>) DM molecules were stably transfected in HeLa DO<sup>+</sup> cells. Expression of both proteins was confirmed by intracellular staining and flow cytometry (Fig. 2.6). Since HLA-DO is absolutely dependent on DM association to egress the ER (43) and gain access to the endocytic pathway, we first verified the ability of mutant HLA-DM to direct the transport of DO. Immunofluorescence microscopy showed that HLA-DO reaches the endocytic pathway in the presence of either the wild-type or the DM<sub>W62A/W120A</sub> molecule (Fig. 2.7). As opposed to the diffuse ER-like pattern of expression observed for DO in DM<sup>-</sup> cells (Fig. 2.7b), defined HLA-DO containing vesicles can be seen in DM<sup>+</sup> cells (Fig. 2.7; d,f). The colocalization between DO and DM<sub>W62A/W120A</sub> in the endocytic pathway (Fig. 2.7; e-f) strongly argues for an efficient interaction between the two molecules, allowing DO to egress the ER.

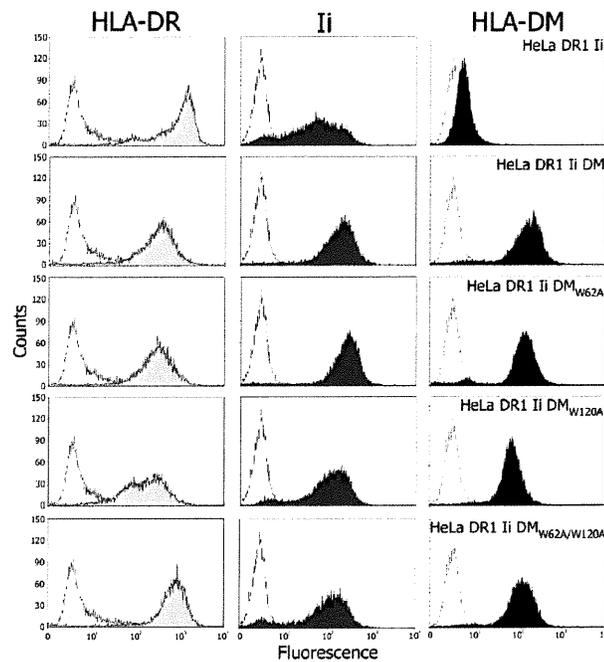
The interaction between DO and DM was confirmed by co-immunoprecipitation experiments. Cells were lysed in 1% Triton X-100 and DO was immunoprecipitated using a polyclonal antibody against the cytoplasmic tail of the  $\beta$  chain. Western blotting with antibodies specific for DM or DO showed that wild-type DM and the  $DM_{W62A/W120A}$  double mutant were both efficiently co-immunoprecipitated with DO (Fig.2.7B). Altogether, these results suggest that  $\alpha 62$  and  $\beta 120$  tryptophans on HLA-DM are dispensable for the interaction with DR or DO.

## 2.6. FIGURES

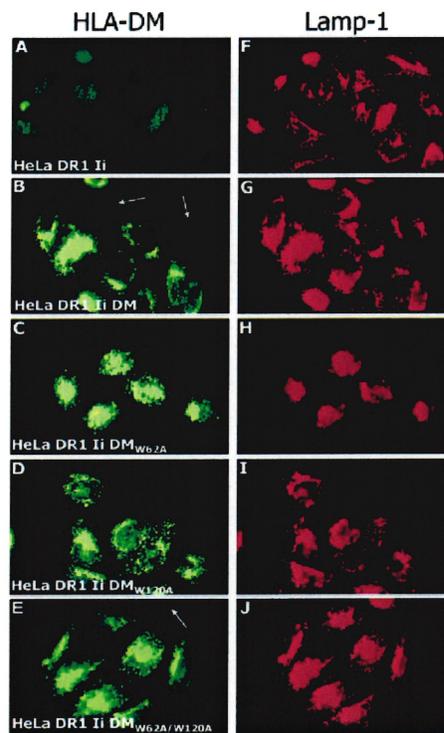
### FIGURE 2.1



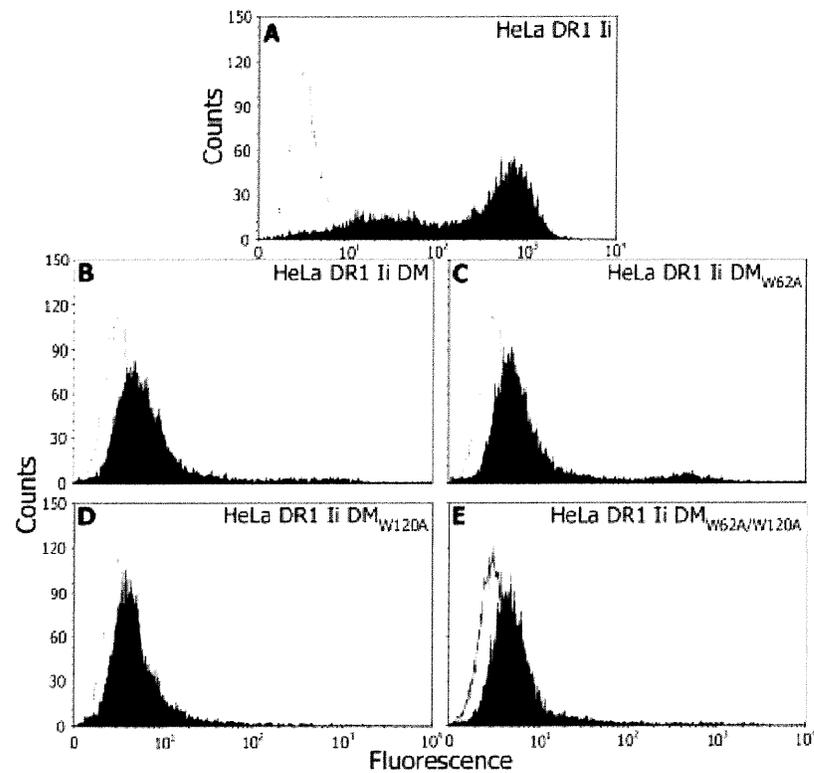
**Position of mutations on HLA-DM.** Highlighted tryptophans 62 and 120 are located on the same lateral face of HLA-DM in the  $\alpha 1$  and  $\beta 2$  domains, respectively. The genebank accession numbers are NM\_006120 for DM $\alpha$  (red) and NM\_002118 for DM $\beta$  (orange) (10). Molecular modeling was done with protein data bank reference number 1HDM and analyzed with Swiss PDB Viewer (19).

**FIGURE 2.2**

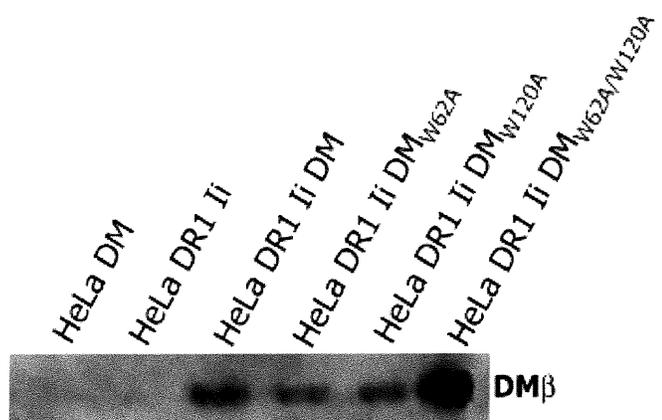
**Expression of HLA-DR, invariant chain and HLA-DM in transfected HeLa cells.** HeLa DR1 cells were stably transfected with the p35 form of the invariant chain cDNA and the cell population was supertransfected with cDNAs for wild-type or mutant DM molecules. Flow cytometry analysis was performed on HeLa DR1 Ii, DR1 Ii DM, DR1 Ii DM<sub>W62A</sub>, DR1 Ii DM<sub>W120A</sub> or DR1 Ii DM<sub>W62A/W120A</sub> using L243 mAb for surface HLA-DR staining. BU45 and Map-DM1 mAbs were used for intracellular staining of Ii and DM, respectively. Alexa 488-coupled GAM was used as secondary antibody. Open histograms represent the control fluorescence of HeLa cells incubated in the same conditions.

**FIGURE 2.3**

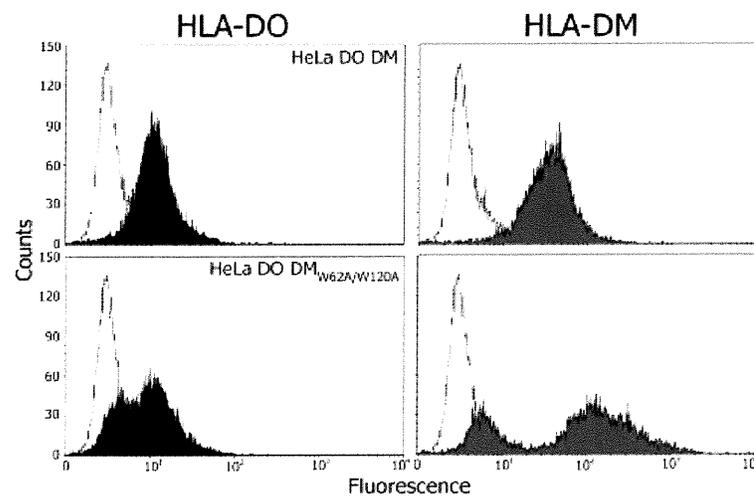
**Mutants of HLA-DM localize in the endocytic pathway.** DR1 Ii (A,F), DR1 Ii DM (B,G), DR1 Ii DM<sub>W62A</sub> (C,H), DR1 Ii DM<sub>W120A</sub> (D,I) and DR1 Ii DM<sub>W62A/W120A</sub> (E,J) cells were analyzed for DM (A-E) and for Lamp-1 (F-J). Immunofluorescence microscopy analysis was performed on permeabilized cells double-stained using a rabbit anti-DM $\beta$  polyclonal antibody and a mouse anti-Lamp-1 mAb. Secondary antibodies were Alexa-488 coupled to goat anti-rabbit and a biotinylated GAM followed by Texas Red-coupled streptavidin. Arrows point to cells not transfected with HLA-DM.

**FIGURE 2.4**

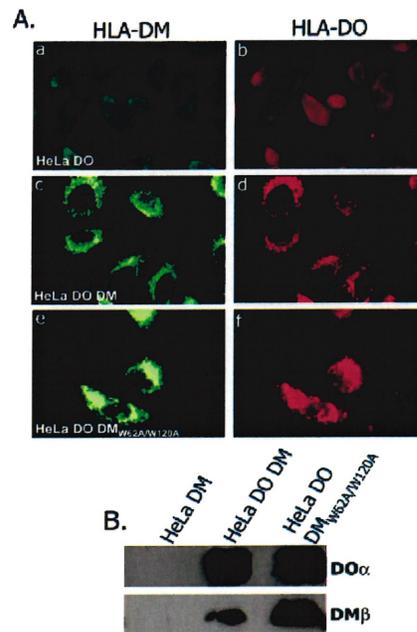
**Mutations on HLA-DM do not impair CLIP release.** Surface flow cytometry analysis was performed using Cer-CLIP monoclonal antibody followed by an Alexa 488-coupled GAM (filled histograms). Open histograms represent the control fluorescence of non-transfected HeLa cells stained in the same conditions.

**FIGURE 2.5**

**HLA-DM mutants bind to HLA-DR.** Transfected HeLa cells were lysed in 1% CHAPS at pH 5 and HLA-DR was immunoprecipitated using L243 mAb. The samples were analyzed on Western blot using the DMβ-specific rabbit serum.

**FIGURE 2.6**

**Expression of HLA-DM and HLA-DO in transfected HeLa cells.** Flow cytometry analysis was performed on saponin-permeabilized cells using a mouse serum against DO $\beta$  (left panels) or Map-DM1 mAb (right panels) followed by Alexa 488-coupled GAM (filled histogram). Open histograms represent the control fluorescence of HeLa DM (left panels) or HeLa cells (right panels) incubated with the same antibodies.

**FIGURE 2.7**

**HLA-DM mutants bind to HLA-DO. (A).** Immunofluorescence microscopy analysis was performed on permeabilized cells double-stained using a rabbit anti-DM $\beta$  (a,c,e) and a mouse anti-DO $\beta$  (b,d,f) sera. Secondary antibodies were Alexa 488-coupled goat anti rabbit and a biotinylated GAM followed by Texas Red-coupled streptavidin. HeLa DO (a-b), HeLa DO DM (c-d) and HeLa DO DM<sub>W62A/W120A</sub> (e-f). **(B)** Cells were lysed in 1% Triton X-100 at pH 7 and co-immunoprecipitations were performed using a DO $\beta$ -specific mouse serum. Samples were analyzed by Western blotting using the DM $\beta$ -specific or DO $\alpha$ -specific rabbit sera.

## 2.7. DISCUSSION

Understanding the molecular mechanism by which HLA-DM and HLA-DM/DO catalyze peptide exchange will allow the development of new approaches for manipulating antigen loading and presentation. With this in mind, we have undertaken the mapping of amino acids involved in the interactions between these molecules. So far, the group of Mellins has characterized regions of HLA-DR that interact with HLA-DM (23,44). Random mutagenesis on HLA-DR allowed the identification of critical residues on a lateral face encompassing both the  $\alpha 1$  and  $\beta 2$  domains. From these experiments, it was proposed that DM releases unstable peptides through its "lever effect" on amino acids DR $\alpha 40$  and  $\alpha 51$ , the last one being critical for stability around the P1 pocket of the groove (23). A role for DM in destabilizing those P1 anchors was also proposed from the results of Chou and Sadegh-Nasseri who showed that mutation of DR1 $\beta$ G86Y rendered the class II rigid (as in a peptide-bound conformation) and reduced the binding to DM (45).

Based on the crystal structure of HLA-DM, the group of Wiley had already proposed that the contact between DMW $\alpha 62$  and DRF $\alpha 51$  could destabilize the P1 pocket and liberate an unstable peptide. Many experimental evidences point to a critical role of such hydrophobic residues in the contact between DM and DR. For example, based on studies measuring the binding of ANS, it was concluded that DR-CLIP complexes display a larger hydrophobic surface than DR molecules associated with stable peptides. Also, there is a preferential association of the two molecules at the acidic pH of endocytic vesicles where both molecules would expose hydrophobic residues (21). The presence of tryptophan residues in those contact regions was deduced by their preferential binding of ANS as well as from spectroscopy studies measuring variations in fluorescence emission between exposed and buried residues (21,45).

Two out of eleven tryptophans are partially exposed and located on the same lateral surface on the crystal structure of DM. These residues may be part of the hydrophobic patches that become accessible to ANS at acidic pH but that are buried in the DM-DR interface (19). While DR $\alpha$ F51 could interact with DM $\alpha$ W62, tryptophan DM $\beta$ 120 may contact those hydrophobic residues identified by Mellins and collaborators in the  $\beta$ 2 domain of DR and which may serve to increase the affinity for DM (23). However, our results presented here do not support such a model. Mutation of the two tryptophans on DM did not disturb the activity, the sorting or the conformation of the protein. Still, the possibility remains that those mutations could finely tune the specificity of DM and influence the peptide repertoire of the class II molecules.

The fact that random mutagenesis on HLA-DR allowed the identification of  $\beta$ F51, L184 and V186 residues certainly suggests the involvement of hydrophobic residues on DM as well (23). However, replacement of residue E187 for a lysine in the  $\beta$ 2 domain also decreased DM binding in these studies. The importance of this charged residue on DR prompted us to evaluate the potential role of positively charged DM $\alpha$ K109, K115 and  $\beta$ R93 and 95 residues. However, the simultaneous mutation of these residues did not inhibit CLIP release by DM in our system (data not shown).

Altogether, our results suggest that the DM/DR interaction relies on other hydrophobic residues in the above-described region or that it may implicate another interface of DM. Indeed, Fremont, Kappler and collaborators identified two other hydrophobic regions that are located on distinct faces

of the H2-M heterodimer (18). Site-directed mutagenesis in the corresponding regions of DM should help delimiting contact sites with DR.

Finally, our results from immunofluorescence and co-immunoprecipitation studies revealed that tryptophans  $\alpha 62$  and  $\beta 120$  on DM are not necessary to make contact with HLA-DO. Although DO also undergoes conformational change following acidification of the environment (46), it first interacts with DM in the ER and the strong association is resistant to lysis in 1% Triton X-100 (43). These observations suggest that the nature of the interactions is likely to differ between DR/DM and DO/DM. The existence of a three-molecular complex between DM/DO/DR suggests the presence of two distinct functional interfaces on DM and random mutagenesis is underway to delineate the contact regions with HLA-DR and DO (47).

## **2.8. ABBREVIATIONS**

ANS, 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid; BSA, bovine serum albumin; CLIP, class II-associated invariant chain peptide; CHAPS, 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate; ER, endoplasmic reticulum; FACS, fluorescence-activated cell sorter; GAM, goat anti-mouse; HLA, human leukocyte antigen; Ii, Invariant chain; mAb, monoclonal antibody; MHC, major histocompatibility complex; MIIC, major histocompatibility complex class II compartment; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulphate.

## **2.9. ACKNOWLEDGMENTS**

Developmental Studies Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa, IA. We thank Dr Eric Cohen for the use of fluorescence microscope, Serge Sénéchal for assistance with the flow cytometer. We also thank Georges Azar, Angélique Belmarre, Alexandre Brunet, Francis Deshaies and Hayssam Khalil for critical reading of the manuscript. A.F. was supported in part by a studentship from Pfizer Canada Inc. This work was supported by grants to J.T. from Medical Research Council of Canada and from the Cancer Research Society Inc. J.T. holds a fellowship from the MRC.

## 2.10. REFERENCES

1. Cresswell, P. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 259-293.
2. Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. (1991) *Nature* **354**, 392-394.
3. Bakke, O. and Dobberstein, B. (1990) *Cell* **63**, 707-716.
4. Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S. L., Quaranta, V., and Peterson, P. A. (1990) *Nature* **348**, 600-605.
5. Roche, P. A. and Cresswell, P. (1990) *Nature* **345**, 615-618.
6. Villadangos, J. A., Bryant, R. A., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Dumenil, A. M., Riese, R. J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G. P., Chapman, H. A., Peters, C., and Ploegh, H. L. (1999) *Immunol. Reviews* **172**, 109-120.
7. Kropshofer, H., Vogt, A. B., and Hammerling, G. J. (1995) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 8313-8317.
8. Romagnoli, P. and Germain, R. N. (1994) *J. of Exp. Med.* **180**, 1107-1113.
9. Denzin, L. K., Hammond, C., and Cresswell, P. (1996) *J. Exp. Med.* **184**, 2153-2165.
10. Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S., and Trowsdale, J. (1991) *Nature* **353**, 571-573.
11. Kropshofer, H., Vogt, A. B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J. S., and Hammerling, G. J. (1996) *EMBO Journal* **15**, 6144-6154.
12. Kropshofer, H., Arndt, S. O., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J., and Vogt, A. B. (1997) *Immunity* **6**, 293-302.
13. Denzin, L. K. and Cresswell, P. (1995) *Cell* **82**, 155-165.
14. Sherman, M. A., Weber, D. A., and Jensen, P. E. (1995) *Immunity* **3**, 197-205.
15. Fung-Leung, W. P., Surh, C. D., Liljedahl, M., Pang, J., Leturcq, D., Peterson, P. A., Webb, S. R., and Karlsson, L. (1996) *Science* **271**, 1278-1281.

16. Martin, W. D., Hicks, G. G., Mendiratta, S. K., Leva, H. I., Ruley, H. E., and Van Kaer, L. (1996) *Cell* **84**, 543-550.
17. Miyazaki, T., Wolf, P., Tourne, S., Waltzinger, C., Dierich, A., Barois, N., Ploegh, H., Benoist, C., and Mathis, D. (1996) *Cell* **84**, 531-541.
18. Fremont, D. H., Crawford, F., Marrack, P., Hendrickson, W. A., and Kappler, J. (1998) *Immunity* **9**, 385-393.
19. Mosyak, L., Zaller, D. M., and Wiley, D. C. (1998) *Immunity* **9**, 377-383.
20. Busch, R., Reich, Z., Zaller, D. M., Sloan, V., and Mellins, E. D. (1998) *J.Biol.Chem.* **273**, 27557-27564.
21. Ullrich, H. J., Doring, K., Grueneberg, U., Jaehnig, F., Trowsdale, J., and Van Ham, M. S. (1997) *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **94**, 13163-13168.
22. Reich, Z., Altman, J. D., Boniface, J. J., Lyons, D. S., Kozono, H., Ogg, G., Morgan, C., and Davis, M. M. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 2495-2500.
23. Doebele, C. R., Busch, R., Scott, M. H., Pashine, A., and Mellins, D. E. (2000) *Immunity*. **13**, 517-527.
24. Denzin, L. K., Robbins, N. F., Carboy-Newcomb, C., and Cresswell, P. (1994) *Immunity* **1**, 595-606.
25. Brunet, A., Samaan, A., Deshaies, F., Kindt, T. J., and Thibodeau, J. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 37062-37071.
26. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene* **77**, 51-59.
27. Panina-Bordignon, P., Fu, X., Lanzavecchia, A., and Karr, R. W. (1992) *J. Exp. Med.* **176**, 1779-1784.
28. Thibodeau, J., Lavoie, P. M., Samaan, A., Corre, J. P., Sékaly, R. P., and Cazenave, P. A. (1998) *Mol. Immunol.* **35**, 885-893.
29. Lavoie, P. M., Thibodeau, J., Cloutier, I., Busch, R., and Sekaly, R. P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 6892-6897.
30. Avva, R. R. and Cresswell, P. (1994) *Immunity*. **1**, 763-774.

31. Lindstedt, R., Liljedahl, M., Peleraux, A., Peterson, P. A., and Karlsson, L. (1995) *Immunity* **3**, 561-572.
32. Copier, J., Kleijmeer, M. J., Ponnambalam, S., Oorschot, V., Potter, P., Trowsdale, J., and Kelly, A. (1996) *J. Immunol.* **157**, 1017-1027.
33. Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J., and Bonifacio, J. S. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 351-369.
34. Monji, T., McCormack, A. L., Yates, J. R., III, and Pious, D. (1994) *J. Immunol.* **153**, 4468-4477.
35. Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., Monaco, J. J., and Mellins, E. (1994) *Nature* **368**, 551-554.
36. Sanderson, F., Thomas, C., Neefjes, J., and Trowsdale, J. (1996) *Immunity* **4**, 87-96.
37. Jensen, P. E. (1998) *Curr Biol* **8**, 128-31.
38. Alfonso, C. and Karlsson, L. (2000) *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 113-142.
39. van Ham, M., van Lith, M., Griekspoor, A., and Neefjes, J. (2000) *Immunogenetics* **51**, 765-770.
40. van Ham, M., van Lith, M., Lillemeier, B., Tjin, E., Gruneberg, U., Rahman, D., Pastoors, L., van Meijgaarden, K., Roucard, C., Trowsdale, J., Ottenhoff, T., Pappin, D., and Neefjes, J. (2000) *J. Exp. Med.* **191**, 1127-1136.
41. Denzin, L. K., Sant'Angelo, D. B., Hammond, C., Surman, M. J., and Cresswell, P. (1997) *Science* **278**, 106-109.
42. Perraudeau, M., Taylor, P. R., Stauss, H. J., Lindstedt, R., Bygrave, A. E., Pappin, D. J., Ellmerich, S., Whitten, A., Rahman, D., Canas, B., Walport, M. J., Botto, M., and Altmann, D. M. (2000) *Eur. J. Immunol.* **30**, 2871-2880.
43. Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W. P., Jackson, M., Peterson, P. A., and Karlsson, L. (1996) *EMBO Journal* **15**, 4817-4824

44. Guerra, C. B., Busch, R., Doebele, R. C., Liu, W., Sawada, T., Kwok, W. W., Chang, M. D., and Mellins, E. D. (1998) *J. Immunol.* **160**, 4289-4297.
45. Chou, C. L. and Sadegh-Nasseri, S. (2000) *J. Exp. Med.* **192**, 1697-1706.
46. 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., and Karlsson, L. (1998) *Immunity* **8**, 233-243.
47. Kropshofer, H., Vogt, A. B., They, C., Armandola, E. A., Li, B. C., Moldenhauer, G., Amigorena, S., and Hammerling, G. J. (1998) *EMBO Journal* **17**, 2971-2981.

**CHAPITRE 3**  
**RÉSULTATS**  
**COMPLÉMENTAIRES**

### 3.0. L'ÉTUDE DE QUATRE CHARGES DE HLA-DM

Suite à l'analyse des résidus W62 et W120 de DM, nous nous sommes penchés sur l'étude de d'autres résidus spécifiques. Nous avons tenté de cibler l'interaction à l'aide des différentes mutations établies par le groupe du Dr Mellins. Plusieurs charges semblaient importantes pour l'interaction entre les deux molécules, la plus importante étant le résidu DR $\alpha$ E40 (Figure 1.13 ; Flèche bleue, p.50). En effet, la molécule mutée en DR $\beta$ D152 semble avoir un défaut de conformation et celle mutée en DR $\beta$ E187 semble pouvoir dissocier partiellement CLIP. En comparaison, le résidu DR $\alpha$ E40 ne dissocie que très peu CLIP et ne lie pratiquement pas DM [164].

Nous avons donc déterminé une série de charges complémentaires sur HLA-DM pouvant être impliquées et étant conservées chez plusieurs espèces. Suite à l'analyse des différents résidus chargés positivement (Histidine (H), Lysine (K) et Arginine (R)) sur la structure 3D de HLA-DM, nous avons sélectionné quatre charges considérablement exposées situées sur les chaînes  $\alpha$  (K109, K115) et  $\beta$  (R93, R95) (Figure A.1, p.cxxxvi).

Suite à la visualisation de l'exposition marquée de ces résidus sur la molécule, nous avons muté ces charges pour des alanines. Puis, ces mutants ont été exprimés avec les chaînes  $\alpha\beta$  de DR1 et avec la chaîne invariante dans des cellules épithéliales rénales 293T. Il nous a donc été possible de déterminer, par cytométrie en flux, si ces mutants de HLA-DM permettaient toujours la dissociation de CLIP de la niche peptidique des molécules de classe II. Comme nous avons pu le constater, les molécules de DM possédant les quatre mutations sont toujours aptes à enlever CLIP (Figure A.2 ; C, p.cxxxvii), tout comme la molécule DM de type sauvage (Figure A.2 ; B, p.cxxxvii). En l'absence de DM, CLIP peut difficilement se dissocier des classes II (Figure A.2 ; A, p.cxxxvii). Ce résultat est d'autant

plus valable qu'il semble y avoir plus de molécules de classe II et de chaîne invariante dans les cellules exprimant ce mutant de HLA-DM (Figure A.2 ; C, p.cxxxvii).

Afin de confirmer que ces mutations n'affectent pas le ciblage intracellulaire de HLA-DM, nous avons effectué des études de microscopie par immunofluorescence. Comme nous l'avons mentionné dans la revue de littérature, HLA-DM possède un motif de ciblage de type YTPL, qui lui confère la capacité de se rendre aux endosomes [78;80;82]. Comme nous pouvons observer à l'appendice 3, la molécule HLA-DM<sub>K109AK115AR93AR95A</sub> semble sortir du réticulum endoplasmique, car le marquage se retrouve à l'intérieur de vésicules parsemées dans le cytoplasme (Figure A.3; C, p.cxxxviii), ce patron est similaire à celui observé dans les cellules exprimant des molécules DM de type sauvage (Figure A.3 ; B, p.cxxxviii).

Finalement, nous avons vérifié si ces mutants s'associaient avec HLA-DO. Étant donné la grande homologie entre les molécules de classe II classiques et DO, il se pourrait que DO se lie aux sites sélectionnés. HLA-DM se lie à HLA-DO dans le réticulum endoplasmique et permet sa sortie vers la voie endosomale [139]. Comme nous pouvons le distinguer à l'appendice 3, HLA-DO est aussi présente dans les vésicules lorsque les molécules de DM mutées sont présentes, ce qui laisserait croire que HLA-DM peut toujours s'associer à HLA-DO<sup>1</sup> (Figure A.3; G, p.cxxxviii).

Somme toute, ces quatre mutations ne semblent pas affecter ni la structure, ni la fonction de HLA-DM. Cette molécule peut donc sortir du

---

<sup>1</sup> HLA-DM permet la sortie de HLA-DO du réticulum endoplasmique et dirige celle-ci vers les compartiments lysosomaux. La présence de HLA-DO dans les lysosomes démontre indirectement la formation de complexes DM/DO.

reticulum endoplasmique, favoriser la dissociation de CLIP sur les molécules de classe II et s'associer à HLA-DO.

### **3.1. L'ÉTUDE DE LA CYSTÉINE LIBRE DE HLA-DM**

La molécule HLA-DM possède deux ponts disulfures de plus que la molécule classique HLA-DR. Ces cystéines se retrouvent dans les domaines  $\alpha 1\beta 1$  et pourraient être importantes pour les fonctions de la protéine (Figures 1.8 et 1.14, p.30,51) [61;62;165]. Cependant, la cristallographie de H2-M a permis d'identifier une cystéine libre non-conservée sur les classes II classiques, mais conservée sur la chaîne  $\beta$  de HLA-DM et ce, chez différentes espèces [61]. L'hypothèse était à l'origine, que la cystéine  $\beta 34$  pouvait changer de partenaire avec la cystéine libre  $\beta 46$ , pour modifier la conformation et la fonction de la protéine. Toutefois, aucune molécule conformée de la sorte n'a été identifiée lors de la cristallographie. Nous avons donc vérifié l'hypothèse selon laquelle ce résidu pourrait être important pour l'activité de DM. Nous pouvons distinguer la position de ce résidu à la figure A.4 (p.cxxxix).

Nous avons muté ce résidu pour une alanine et étudié son importance pour la catalyse de CLIP de la niche peptidique dans une lignée épithéliale 293T exprimant la molécule de classe II classique HLA-DR et la chaîne invariante. Nous avons, par la suite, analysé par cytométrie en flux la présence de CLIP à la surface cellulaire. Ce site muté ne s'est pas avéré important pour les fonctions de DM, puisque la molécule semblait toujours pouvoir enlever le CLIP de la niche peptidique (Figure A.5, p.cxl). En effet, l'ajout du mutant (Figure A.5; C, p.cxl) ou de DM de type sauvage (Figure A.5 ; B, p.cxl) catalyse la relâche de CLIP sur les molécules de classe II. En comparaison,

les cellules sans HLA-DM ne peuvent réussir à enlever CLIP et ce peptide est présent à la surface cellulaire (Figure A.5 ; A, p.cxl).

Une étude antérieure a analysé l'effet d'un mutant de DM en position C79. Cette recherche a révélé que le pont disulfure formé par cette cystéine était très important pour la structure de la molécule. En effet, ce mutant de DM sortait inefficacement du réticulum endoplasmique et était dégradé rapidement [61;165]. Suite à cette observation, nous nous sommes questionné à savoir si notre mutant possédait un défaut de structure et s'il pouvait sortir du réticulum endoplasmique [78;80;82]. Comme nous pouvons le voir à l'appendice 3, DM C46A possède toujours la capacité de localisation aux endosomes (Figure A.3; D, p.cxxxviii), tout comme la molécule DM de type sauvage (Figure A.3 ;B , p.cxxxviii). De plus, ce mutant interagit toujours efficacement avec DO si on en juge par sa capacité à relocaliser DO au niveau de la voie endocytaire (sortie de DO du réticulum endoplasmique) (Figure A.3 ; H, p.cxxxviii)[139].

En sommes, la mutation de la cystéine libre ne semble pas affecter la localisation endosomale, la dissociation de CLIP et la liaison à HLA-DO.

Finalement, toutes les mutations testées pour le site d'interaction sur HLA-DM n'ont dévoilé aucune implication dans l'interaction. Certaines de nos hypothèses reposent sur la mutagenèse effectuée sur DR3. Il est clair dans la littérature que DR3 possède une affinité réduite pour CLIP [93;173]. Bien qu'improbable, il se peut donc que DR1, utilisée dans nos études, interagisse différemment avec DM.

HLA-DM semble être une molécule très différente des classes II classiques. Cette étude nous a permis de percevoir que la mutation de plusieurs charges importantes et d'une cystéine n'affecte pas la conformation de la

molécule. Cette conclusion est rendue possible grâce aux analyses sur lames microscopiques (Figure A.3, p.cxxxviii) et de cytométrie en flux<sup>2</sup> (Figures A.2, p. et A.4, p.cxxxvii, cxxxix). HLA-DM semble donc très stable, sans doute grâce à la présence de deux ponts disulfures de plus que sur les classes II classiques. D'ailleurs, il serait intéressant d'étudier la fonction et l'importance de ces deux ponts disulfures sur une molécule moins stable, comme HLA-DO.

---

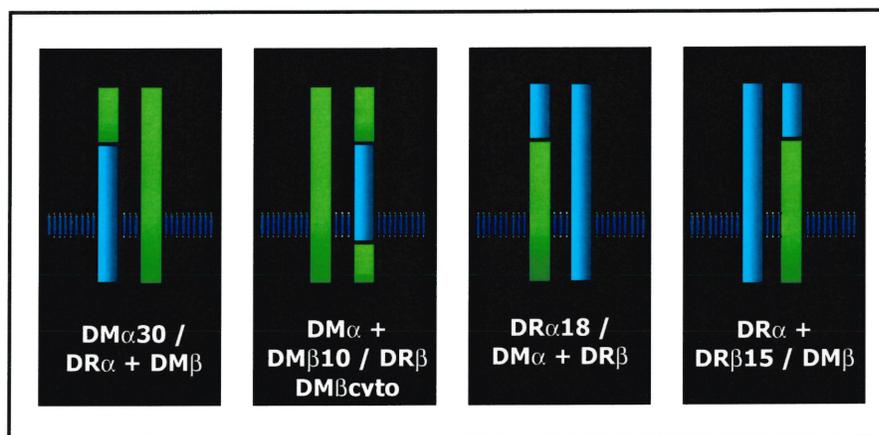
<sup>2</sup> En effet, la présence de HLA-DM dans les compartiments lysosomaux démontre indirectement la stabilité de la molécule, lui permettant de sortir du RE et prévenant sa dégradation précoce. De plus, l'anticorps dirigé contre HLA-DM (MaP.DM1) et utilisé dans nos analyses de cytométrie en flux reconnaît un épitope conformationnel, ce qui permet de conclure sur l'intégrité de la molécule.

# **CHAPITRE 4**

# **DISCUSSION**

#### 4.0. LA PRODUCTION DE MOLÉCULES CHIMÉRIQUES

Nous avons donc tenté, durant notre étude, de délimiter les sites de l'interaction entre HLA-DR et HLA-DM. En premier lieu, nous avons effectué la construction de différentes molécules chimériques entre DR et de DM. Comme nous pouvons le voir à la figure 4.1 (p.93), ces travaux devraient nous permettre d'isoler chacune des chaînes des deux molécules,  $\alpha$  et  $\beta$ , pour découvrir lesquelles étaient responsables de l'interaction.



**Figure 4.1. Molécules chimériques créées entre HLA-DR et HLA-DM permettant d'isoler chacune des chaînes, afin de déterminer les chaînes responsables de l'interaction. En bleu, nous pouvons distinguer HLA-DR et en vert HLA-DM.**

Toutefois, cette étude n'a pas dévoilé de résultats concluants, par le fait que les molécules ne semblaient pas être fonctionnelles<sup>1</sup>. Il est important de souligner que ce travail ne nous aurait peut-être pas été profitable, puisqu'une étude de mutagenèse aléatoire sur la molécule HLA-DR a déterminé des sites substantiels pour la liaison de HLA-DM de part et

<sup>1</sup> Nous avons analysé l'expression de ces chimères en microscopie à fluorescence après une transfection stable de ces constructions dans des cellules HeLa. Ces travaux nous ont

d'autre des deux chaînes DR $\alpha$  et DR $\beta$  [164]. Il faut donc percevoir les molécules de classe II comme un tout entier, composé de deux chaînes, mais dont les sites d'interactions font partie d'un espace sur la molécule et ne constituent pas uniquement de chaînes simples.

Suite à ces travaux, nous nous sommes penchés sur l'analyse de résidus spécifiques pouvant permettre l'interaction entre les deux molécules de classe II.

## **4.1. L'INTERACTION HYDROPHOBIQUE ENTRE HLA-DR ET HLA-DM**

### **4.1.1. L'implication des résidus W62 et W120 de HLA-DM**

La structure cristalline de HLA-DM a illustré deux résidus hydrophobes exposés à 50% sur la molécule, les acides aminés W62 et W120 (Figure 2.1, p.70) [62]. Étant donné la position préférentielle de ces deux résidus et l'implication probable de liaisons hydrophobes (chapitre 1, p.53), nous avons muté ces deux acides aminés pour des alanines (W62A, W120A). Les alanines ont été sélectionnées puisque qu'elles sont de petites tailles et qu'elles ne risquent pas de modifier énormément la conformation de la molécule mutante. Cependant la mutation de ces résidus n'a pas affecter la dissociation de CLIP (Figure 2.4, p.73), l'interaction entre HLA-DR et HLA-DM (Figure 2.5, p.74) et la liaison à HLA-DO (Figure 2.7, p.76). Il semble donc peu probable que ces résidus soient impliqués directement ou indirectement dans l'association avec HLA-DR. De plus, la présence de ces

---

permis de découvrir que ces molécules étaient séquestrées dans le réticulum endoplasmique, par l'absence de colocalisation dans des vésicules lysosomales.

mutants dans les compartiments endosomaux nous permet de conclure que ces résidus ne contribuent probablement que très peu à la structure globale stabilisée. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que ces mutants affectent la stabilité moléculaire de HLA-DM dans les CPA humains. Cette possibilité pourrait être évaluée à l'aide de *Knock-in*.

### **3.1.2. Autres résidus hydrophobes potentiellement impliqués dans l'interaction**

Nous pouvons donc concevoir que la liaison entre HLA-DR et HLA-DM demeure de nature hydrophobe et qu'elle utilise d'autres sites d'interaction que les résidus W62 et W120. Quelle pouvait être la nature exacte de ces résidus et comment orienter la mutagenèse dirigée sur HLA-DM? Afin de répondre à ces questions, nous avons procédé à une analyse systématique de tous les sites hydrophobes conservés possédant un niveau de liaison élevé à l'ANS. Pour ce faire nous avons aligné les séquences de DM $\alpha$  et de DM $\beta$  connues (humain, souris, bovin, rat et lapin) (Figure 4.2, p.96). Nous avons examiné chacun des différents types de résidus possédant une hydrophobicité élevée (Phénylalanine (F)(2.7 Hf), Isoleucine (I) (2.95 Hf), Tryptophane (W) (3 Hf) et Tyrosine (Y)(2.85 Hf)<sup>2</sup>) et nous avons retenu ceux étant conservés dans chacune des différentes espèces, en prenant pour acquis que l'interaction entre les molécules de classe II et HLA-DM est identique indépendamment de l'espèce animale (Figure 4.2; étoiles, p.96). En effet, certaines études ont démontré que HLA-DM peut interagir avec les molécules de classe II murines et vice versa, ce qui suppose qu'il en est de même pour les molécules des autres espèces [67;95;172].

---

<sup>2</sup> Hf désigne l'unité de mesure de l'hydrophobicité moyenne d'un acide aminé (Kcal/res). Chaque acide aminé qui requière de l'énergie pour transférer d'un environnement hydrophobique à un environnement aqueux est désigné par une valeur d'énergie de transfert moins l'énergie de transfert de la glycine [186].

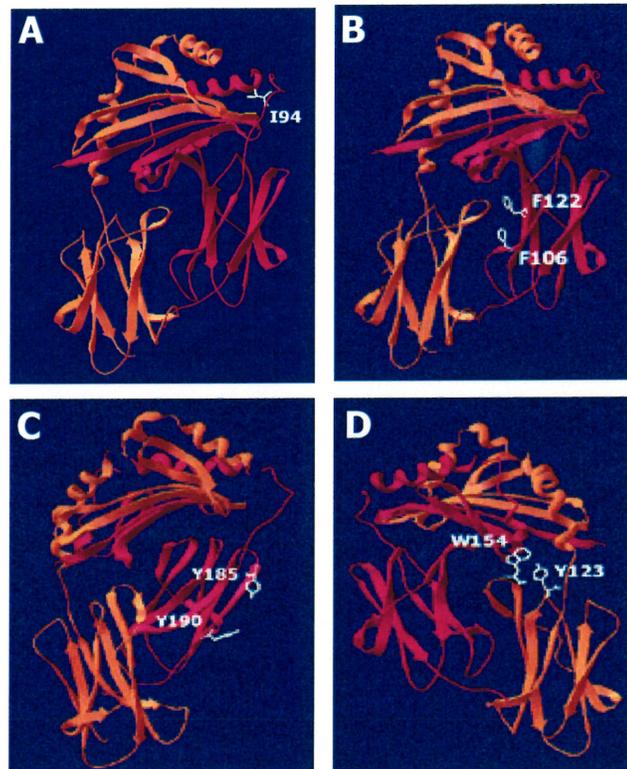


**Figure 4.2. Alignement de séquence de DM $\alpha$  et de DM $\beta$  humains (extracytoplasmique) (NM\_006120, NM\_002118), de souris (NM\_010386, NM\_010387, NM\_010388), Bovin (D76416, D76417), de rat (U31598, U31599) et de Lapin (U77895, U77896). Les résidus sélectionnés sont conservés et de nature hydrophobe (\*), chargés positivement (◇) ou de type cystéine libre (○). Les résidus exposés et testés sont en bleu, les résidus exposés et non-testés à la surface de la structure cristalline de HLA-DM humaine sont en rouge et les résidus non exposés sont en vert.**

Par la suite, nous avons examiné la position de chacun de ces résidus hydrophobes conservés sur le cristal de la molécule, à l'aide d'un logiciel nous permettant de visualiser en 3D la molécule HLA-DM (SPDBV). Ainsi, nous avons été en mesure de déterminer tous les sites hydrophobes étant préférentiellement positionnés. Ces résultats sont résumés aux figures

A.6 (conservés sur DM $\alpha$ ; gras, p.cxli) et A.7 (conservés sur DM $\beta$ ; gras, p.cxlii).

Nous pouvons visualiser le degré d'exposition des résidus sélectionnés sur la structure cristalline de la molécule HLA-DM à la figure 4.3 (p.97).



**Figure 4.3. Résidus hydrophobes (I, F, W ou Y) exposés sur la structure cristalline humaine de HLA-DM. I94 (A) F106, F122 (B), Y185 et Y190 (C) (blanc) sont sur DM $\alpha$  (rouge) et Y123 et W154 (D) sont sur DM $\beta$  (orange). Les numéros d'accèsion sont NM\_006120 pour DM $\alpha$  et NM\_002118 pour DM $\beta$  humain [60]. Le modèle moléculaire a été réalisé à l'aide de la banque de données protéiques numéro 1HDM et analysé par *Swiss PDB Viewer* [62].**

Bien que nous n'ayons pas été en mesure de déterminer les résidus importants de HLA-DM pour son interaction avec HLA-DR, il semble que le

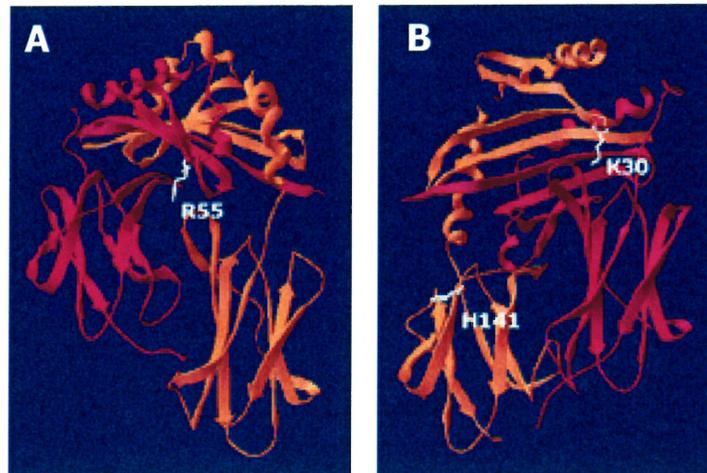
rôle de l'interaction hydrophobe soit critique. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet des différents acides aminés I94, F106, F122, Y185, Y190, Y123 et W154. Nous pouvons aussi considérer le fait qu'une exposition de sites hydrophobes à pH acide ne puisse qu'être une conséquence du changement de conformation et par le fait même que ces résidus ne soient pas impliqués directement dans l'interaction moléculaire.

## **4.2. L'INTERACTION DE TYPE PONT SALIN ENTRE HLA-DR ET HLA-DM**

### **4.2.1. Autres résidus chargés potentiellement impliqués dans l'interaction**

Nos résultats suggèrent que l'interface incluant les tryptophanes W62 et W120 n'est pas impliquée dans le contact avec DR. Nous pouvons donc concevoir que certains autres résidus exposés dans d'autres régions de HLA-DM, puissent réguler l'interaction. Nous avons donc analysé la position de tous les autres résidus chargés positivement (H, K et R) et conservés chez différentes espèces (Figure 4.2; losanges, p.96). Les résidus conservés sont énumérés aux figures A.8 (DM $\alpha$ ; gras, p.cxliv) et A.9 (DM $\beta$ ; gras, p.cxliv).

Nous pouvons aussi voir la position des résidus exposés sur la structure cristalline de HLA-DM (Figure 4.4, p.99).



**Figure 4.4. Résidus chargés positivement (H/K/R) exposés sur la structure cristalline de HLA-DM. R55 (A)(blanc) est sur  $DM\alpha$  (rouge) et K30 et H141 (B)(blanc) sont sur  $DM\beta$  (orange). Les numéros d'accèsion sont NM\_006120 pour  $DM\alpha$  et NM\_002118 pour  $DM\beta$  (orange) [60]. Le modèle moléculaire a été réalisé à l'aide de la banque de données protéiques numéro 1HDM et analysé par *Swiss PDB Viewer* [62].**

Les résidus chargés positivement étudiés n'ont donc pas permis d'éclaircir le site d'interaction sur HLA-DM. Cependant, nous pouvons imaginer que les résidus R55, K30 et H141 pourraient médier l'interaction avec les molécules de classe II.

Il est important de mentionner que l'analyse précédente a été réalisée à l'aide de la structure du cristal de HLA-DM, donc toute anomalie dans la molécule due à la cristallisation pourrait affecter notre analyse. Pensons seulement à la queue cytoplasmique et à la région transmembranaire qui pourraient modifier la conformation de la molécule. En effet, les parties transmembranaires et cytoplasmiques semblent importantes, mais non-essentiels, pour l'activité de DM. Le rôle de ces fractions serait au niveau de l'efficacité de l'alignement membranaire [124;125]. Néanmoins, aucune

étude de structure n'a démontré de changement dans la conformation suite à l'ajout des régions cytoplasmiques et transmembranaires.

### **4.3. LES MÉCANISMES D'ACTION DE HLA-DM**

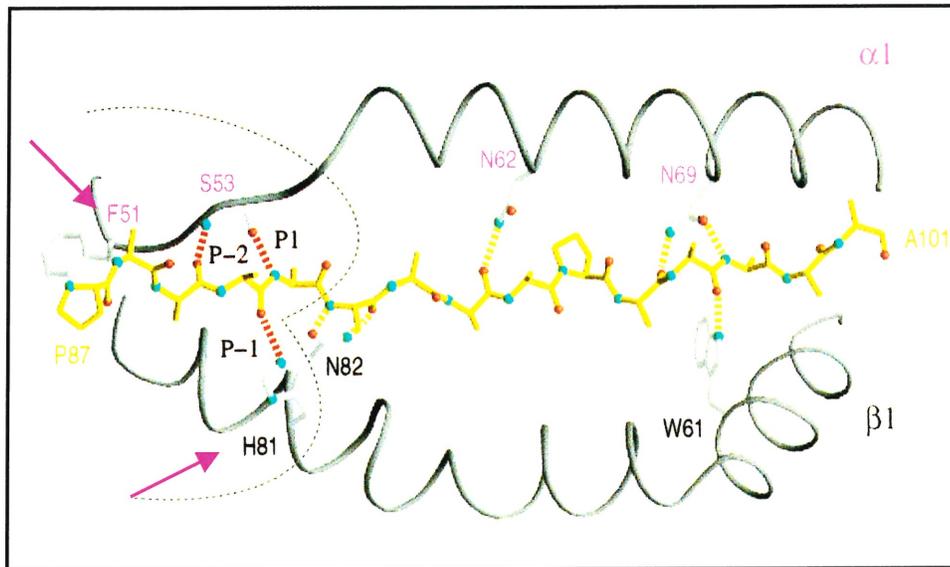
Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer le mécanisme d'action exact de DM. La niche peptidique pourrait osciller entre une conformation ouverte et fermée. DM pourrait s'y lier et prolonger la demi-vie du conformère ouvert. Ceci briserait quelques interactions avec CLIP et permettrait finalement la totale dissociation de CLIP. Une autre hypothèse est que DM pourrait interagir directement avec la niche peptidique occupée par CLIP et induirait un changement conformationnel, qui résulterait avec la dissociation de CLIP. Ces deux hypothèses impliquent deux conformations, qui ont pu être démontrées par des études de résistance au SDS et par des analyses spectroscopiques [174-176]. Toutefois, ces deux états du classe II n'ont pas été visualisés sur le cristal de DR, certaines formes ne pouvant être cristallisées.

Les fonctions de DM pourraient aussi être expliquées par sa fonction de chaperonne. DM se lierait de façon transitoire à une conformation ouverte des molécules classe II instable, pour en augmenter la demi-vie. Le complexe DM/classe II favoriserait la dissociation du peptide instable, jusqu'à ce qu'un peptide plus stable se lie à la niche peptidique. Le changement de conformation induit par le peptide stable encouragerait la dissociation de DM, et le complexe pourrait migrer à la surface cellulaire pour la présentation aux lymphocytes T [106].

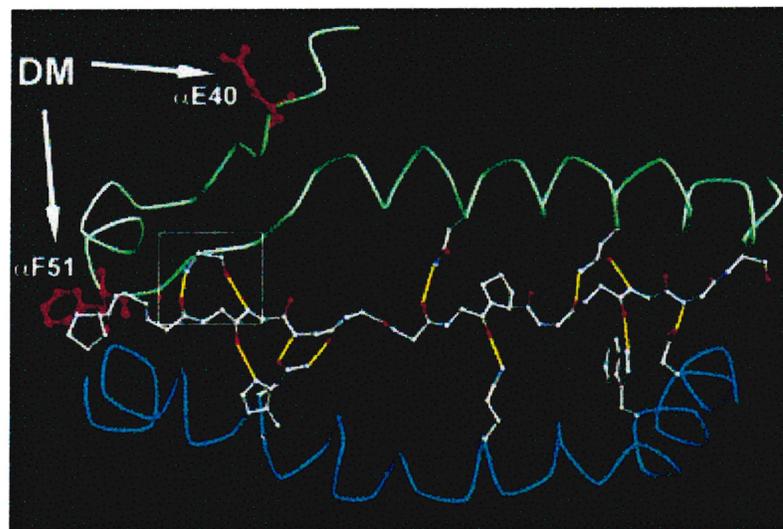
### 3.4.1. Le modèle d'interaction entre HLA-DM et HLA-DR

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'interaction entre DR et DM implique bel et bien la partie N-terminale de la niche peptidique. Plusieurs études nous permettent de croire en cette hypothèse. Premièrement, l'anticorps Cer-CLIP, liant la partie N-terminale de CLIP, inhibe l'interaction avec HLA-DM [84]. Ensuite vient l'importance des résidus E40 et F51, démontré par le groupe de Mellins [164]. Finalement, l'implication du résidu peptidique en position P1 de la niche, est aussi situé à proximité des sites E40 et F51 [105].

L'étude de Mellins n'a pas déterminé de sites importants dans le domaine  $\alpha 2$  de HLA-DR. La région de liaison serait donc entre les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 2$ . Le mécanisme établit qu'il y aurait un premier contact entre F51 et un résidu hydrophobe exposé sur DM (I94, F106, F122, Y185, Y190, Y123 ou W154). Cette interaction produirait le bris de deux liaisons hydrogènes entre la niche peptidique et le corps du peptide (P-1 et P-2). Ensuite, il y aurait contact entre deux charges opposées de DR et de DM, ce qui produirait le bris d'un troisième pont hydrogène en P1 [178;179]. L'interaction de DM permettrait finalement la rupture des trois ponts en N-terminal du peptide. Les premières spéculations du groupe de Wiley étaient que  $\beta H81$  de DR lierait  $\alpha D81$  de DM (Figure 4.5, p.102). Des études antérieures ont démontré que la mutation de ce résidu produisait un défaut de conformation de DR et que cette molécule demeurait séquestrée dans le RE [13-15]. Voilà sans doute pourquoi ce résidu n'a pas été identifié par la mutagenèse aléatoire du groupe de Mellins. Cependant, nous pourrions concevoir que le modèle puisse aussi être que E40 de DR lierait R55, K30 ou H141 tel que suggéré par notre analyse (Figure 4.6, p.102) [164].



**Figure 4.5. Modèle de l'interaction entre HLA-DM et HLA-DR d'après le groupe de Wiley. Les flèches roses indiquent la liaison potentielle de DM aux molécules de classe II (Adapté de Mosyak et al, Immunity, 1998) [62].**



**Figure 4.6. Modèle de l'interaction entre HLA-DM et HLA-DR d'après le groupe de Mellins. Les flèches blanches indiquent la liaison potentielle de DM aux molécules de classe II (Adapté de Doebele et al., Immunity, 2000) [164].**

De plus, il y aurait sans doute d'autres interactions plus faibles, qui viendraient stabiliser plus fortement la liaison entre les deux molécules. En exemple, le résidu L184 $\beta$  de DR pourrait être impliqué secondairement dans l'interaction. Ce résidu démontre une importance moins prononcée, que le résidu F51, comme démontré par les recherches du groupe de Mellins (Figure 1.13, p.50). Ainsi, l'interaction impliquerait des sites primaires et des sites secondaires.

### **3.4.2. Une interaction en tête à tête**

Nous pourrions aussi spéculer que l'interaction avec HLA-DR se ferait par les domaines DR $\alpha$ 1 $\beta$ 1 et DM $\alpha$ 1 $\beta$ 1 dans une interaction rappelant la reconnaissance par le TCR, puisqu'il a été démontré que HLA-DM et les classes II ne se retrouvent pas sur les mêmes vésicules des endosomes et subséquemment que les deux différentes molécules pourraient se retrouver face à face [180]. En effet, les endosomes sont formés de multiples vésicules. Les molécules du CMH se localisent principalement dans les vésicules internes des corps multivésiculaires (MVB). Au contraire DM se retrouve dans les vésicules externes. Ainsi, les portions lumineales pourraient se rejoindre. Nous avons précédemment analysé les différents résidus conservés et exposés. Nous avons découvert quelques résidus pouvant servir d'intermédiaire de cette interaction, en plus de ceux décrits précédemment, F45, F47 (chaîne  $\alpha$  feuillet  $\beta$ ) I72, F74 et F78 (Chaîne  $\alpha$  Hélice  $\alpha$ ) et Y24 et F28 (Chaîne  $\beta$ ) (Figure 4.2, p.96 ; Figure A.6 et A.7 ; \*, p.cxli, cxlii). Cette interaction est toutefois peu probable, puisque les résidus en interaction devront être exposés peu importe le peptide lié dans la niche peptidique de CMHII.

### 3.4.3. Les autres moyens de cerner les résidus importants pour l'interaction

D'autres techniques nous permettraient également de déterminer les sites d'interaction entre HLA-DR et HLA-DM. Nous pourrions utiliser la technique du FliTrx<sup>TM3</sup> ou du *Phage Display* utilisant une librairie de peptides. Ces techniques nous permettraient d'isoler les peptides interagissant avec HLA-DR. Nous pourrions, par la suite, analyser ces peptides et les comparer à la séquence de HLA-DM. Cependant, cette technique comporte une limite considérable, puisque plusieurs peptides pourraient se lier à la niche peptidique des classes II. Nous pourrions remédier au problème en utilisant des molécules de classe II possédant un peptide lié de façon covalente à la niche peptidique [181]. La technique de mutagenèse aléatoire serait aussi une technique de choix pour résoudre le problème. Cependant, l'ultime moyen demeure d'effectuer la structure cristalline du complexe DM/CMHII. Il semble que la cristallographie de ces complexes soit difficile, dû à la faible association des deux molécules.

### 3.4.4. Faire une pierre deux coups

Il est important de noter que si nous déterminons les résidus importants pour l'interaction avec HLA-DM nous pouvons extrapoler que ces mêmes résidus seront importants pour l'association avec HLA-DO. En effet, comme nous l'avons mentionné ultérieurement HLA-DO possède une grande homologie avec HLA-DR et pourrait compétitionner avec celui-ci pour la liaison à DM, réduisant ainsi la relâche de CLIP. Les sites d'interaction importants devraient donc être les mêmes sur HLA-DO. Cependant, si l'on croit certaines études qui démontrent la formation d'un complexe tri-

---

<sup>3</sup> Le FliTrx<sup>TM</sup> consiste en une librairie aléatoire de dodécapeptides exprimée à la surface de *E. coli* sur la protéine flagellaire majeure (FliC) et sur la thioredoxine (TrxA) (Invitrogen).

moléculaire, il faudrait rejeter cette hypothèse. C'est pourquoi la détermination des sites d'interaction sur HLA-DM pourrait nous aider à préciser le modèle d'action de ces molécules et notre compréhension de la présentation antigénique.

# **CHAPITRE 5**

# **CONCLUSION**

Les fonctions de HLA-DM sont maintenant bien établies grâce à des modèles de lignées de cellules mutantes, à des études entre protéines solubles et à des modèles de souris transgéniques. Il semble donc que les fonctions de DM dépendent de plusieurs facteurs : entre autres du ratio de molécules classe II, de la présence d'un bon ligand peptidique, du pH des compartiments endosomaux/lysosomaux, de la présence de diverses protéases, du niveau de dissociation de CLIP, de la stabilité des dimères  $\alpha\beta$  de classe II et finalement de la présence de HLA-DO.

Nous nous sommes penchés sur l'analyse de l'interaction entre HLA-DR et HLA-DM. Bien que nous n'ayons pas été en mesure de clarifier l'état de la liaison, nous croyons que les différents sites potentiels énumérés pourraient être impliqués. Des études de mutagenèse aléatoire et de cristallographie nous permettront de clarifier les motifs essentiels à la fonction de la molécule et nous aideront à mieux comprendre et moduler la présentation antigénique.

Des recherches plus approfondies permettront de définir les résidus importants pour l'interaction et la fonction de HLA-DM sur les molécules du CMH de classe II. En premier lieu, ces résultats sont essentiels afin de comprendre et d'approfondir nos connaissances fondamentales sur la présentation antigénique. De plus, comme nous l'avons souligné dans ce travail, DM pourrait être très importante dans l'élimination de certains cancers, en réduisant la présentation de peptides de faible affinité. La découverte des résidus importants de DM pour l'interaction avec les CMHII pourra nous aider à l'élaboration de thérapies géniques afin de favoriser la modulation du répertoire peptidique lors de certaines pathologies spécifiques. Il sera alors possible d'augmenter l'expression de la portion active de DM pour favoriser la sélection peptidique ou d'inhiber DM afin d'éviter la présentation de certains peptides auto-réactifs.

# **CHAPITRE 6**

# **RÉFÉRENCES**

1. Watts C: **Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules.** *Annu.Rev.Immunol.* 1998, **15**:821-850.
2. Vignali DA: **The interaction between CD4 and MHC class II molecules and its effect on T cell function.** *Behring Inst.Mitt.* 1994,133-147.
3. Beck S, Trowsdale J: **The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence.** *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 2000, **1**:117-137.
4. Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W: **Regulation of MHC class II genes: Lessons from a disease.** *Annu.Rev.Immunol.* 1996, **14**:301-331.
5. Klein J, Sato A: **The HLA system. First of two parts.** *N.Engl.J.Med.* 2000, **343**:702-709.
6. Klein J, Sato A: **The HLA system. Second of two parts.** *N.Engl.J.Med.* 2000, **343**:782-786.
7. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC: **Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1.** *Nature* 1993, **364**:33-39.
8. Sinigaglia F, Hammer J: **Motifs and supermotifs for MHC class II binding peptides.** *J.Exp.Med.* 1995, **181**:449-451.
9. Krensky AM: **The HLA system, antigen processing and presentation.** *Kidney Int.Suppl* 1997, **58**:S2-S7.

10. Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DAA, Lane WS, Strominger JL: **Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles.** *J.Exp.Med.* 1993, **178**:27-47.
11. Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, Shabanowitz J, Cox AL, Sakaguchi K, Appella E, Grey HM, Sette A: **Peptides presented to the immune system by murine class II major histocompatibility complex molecule I-A<sup>d</sup>.** *Science* 1992, **256**:1817-1820.
12. Fremont DH, Hendrickson WA, Marrack P, Kappler J: **Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides.** *Science* 1996, **272**:1001-1004.
13. Sinigaglia F, Hammer J: **Defining rules for the peptide-MHC class II interaction.** *Curr.Opin.Immunol.* 1994, **6**:52-56.
14. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC: **Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1996, **93**:734-738.
15. Sant AJ, Beeson C, McFarland B, Cao J, Ceman S, Bryant PW, Wu S: **Individual hydrogen bonds play a critical role in MHC class II: peptide interactions: implications for the dynamic aspects of class II trafficking and DM-mediated peptide exchange.** *Immunol.Rev.* 1999, **172**:239-253.
16. Knight SC, Stagg AJ: **Antigen-presenting cell types.** *Curr.Opin.Immunol.* 1993, **5**:374-382.

17. Lamb CA, Cresswell P: **Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes.** *J.Immunol.* 1992, **148**:3478-3482.
18. Marks MS, Blum JS, Cresswell P: **Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens.** *J.Cell Biol.* 1990, **111**:839-855.
19. Roche PA, Marks MS, Cresswell P: **Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein.** *Nature* 1991, **354**:392-394.
20. Ashman JB, Miller J: **A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain.** *J.Immunol.* 1999, **163**:2704-2712.
21. Jasanoff A, Wagner G, Wiley DC: **Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii.** *EMBO J.* 1998, **17**:6812-6818.
22. Pieters J: **MHC class II restricted antigen presentation.** *Curr.Opin.Immunol.* 1997, **9**:89-96.
23. Romagnoli P, Germain RN: **The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy.** *J.Exp.Med.* 1994, **180**:1107-1113.
24. Roche PA, Cresswell P: **Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding.** *Nature* 1990, **345**:615-618.

25. Benaroch P, Yilla M, Raposo G, Ito K, Miwa K, Geuze HJ, Ploegh HL: **How MHC class II molecules reach the endocytic pathway.** *EMBO J.* 1995, **14**:37-49.
26. Busch R, Cloutier I, Sekaly R-P, Hammerling GJ: **Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum.** *EMBO J.* 1996, **15**:418-428.
27. Peters PJ, Neefjes JJ, Oorschot V, Ploegh HL, Geuze HJ: **Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments.** *Nature* 1991, **349**:669-676.
28. Vogt AB, Stern LJ, Amshoff C, Dobberstein B, Hammerling GJ, Kropshofer H: **Interference of distinct invariant chain regions with superantigen contact area and antigenic peptide binding groove of HLA-DR.** *J.Immunol.* 1995, **155**:4757-4765.
29. Bakke O, Dobberstein B: **MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments.** *Cell* 1990, **63**:707-716.
30. Lotteau V, Teyton L, Peleraux A, Nilsson T, Karlsson L, Schmid SL, Quaranta V, Peterson PA: **Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain.** *Nature* 1990, **348**:600-605.
31. Odorizzi CG, Trowbridge IS, Xue L, Hopkins CR, Davis CD, Collawn JF: **Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine**

- trafficking to an endocytic processing compartment.** *J.Cell Biol.* 1994, **126**:317-330.
32. Maric MA, Taylor MD, Blum JS: **Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994, **91**:2171-2175.
33. Nakagawa TY, Rudensky AY: **The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation.** *Immunol.Rev.* 1999, **172**:121-129.
34. Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA: **Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading.** *Immunity* 1996, **4**:357-366.
35. Roche PA, Cresswell P: **Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1991, **88**:3150-3154.
36. Bikoff EK, Huang L-Y, Episkopou V, van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ: **Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression.** *J.Exp.Med.* 1993, **177**:1699-1712.
37. Viville S, Neefjes JJ, Lotteau V, Dierich A, Lemeur M, Ploegh H, Benoist C, Mathis D: **Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain.** *Cell* 1993, **72**:635-648.

38. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC: **The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3.** *Nature* 1995, **378**:457-462.
39. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P: **HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides.** *Nature* 1992, **360**:474-477.
40. Sette A, Ceman S, Kubo RT, Sakaguchi K, Appella E, Hunt DF, Davis TA, Michel H, Shabanowitz J, Rudersdorf R, Grey HM, DeMars R: **Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen- processing mutant.** *Science* 1992, **258**:1801-1804.
41. Hitzel C, Koch N: **The invariant chain derived fragment CLIP is an efficient *in vitro* inhibitor of peptide binding to MHC class II molecules.** *Mol.Immunol.* 1996, **33**:25-31.
42. Teyton L, O'Sullivan D, Dickson PW, Lotteau V, Sette A, Fink P, Peterson PA: **Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways.** *Nature* 1990, **348**:39-44.
43. Reich Z, Altman JD, Boniface JJ, Lyons DS, Kozono H, Ogg G, Morgan C, Davis MM: **Stability of empty and peptide-loaded class II major histocompatibility complex molecules at neutral and endosomal pH: comparison to class I proteins.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997, **94**:2495-2500.
44. Avva RR, Cresswell P: **In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides.** *Immunity.* 1994, **1**:763-774.

45. Kropshofer H, Vogt AB, Hammerling GJ: **Structural features of the invariant chain fragment CLIP controlling rapid release from HLA-DR molecules and inhibition of peptide binding.** *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995, **92**:8313-8317.
46. Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER: **Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules.** *Nature* 1985, **317**:359-361.
47. Buus S, Sette A, Colon SM, Jenis DM, Grey HM: **Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition.** *Cell* 1986, **47**:1071-1077.
48. Rammensee H-G, Friede T, Stevanovic S: **MHC ligands and peptide motifs: First listing.** *Immunogenetics* 1995, **41**:178-228.
49. Buus S, Sette A, Colon SM, Jenis DM, Grey HM: **Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition.** *Cell* 1986, **47**:1071-1077.
50. Neefjes JJ, Ploegh HL: **Intracellular transport of MHC class II molecules.** *Immunol.Today* 1992, **13**:179-184.
51. Roche PA: **HLA-DM: an in vivo facilitator of MHC class II peptide loading.** *Immunity* 1995, **3**:259-262.
52. Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee H-G, Coligan JE, Martin R: **Ligand motifs of HLA-DRB5\*0101 and DRB1\*1501 molecules delineated from self-peptides.** *J.Immunol.* 1994, **153**:1665-1673.
53. Mellins E, Smith L, Arp B, Cotner T, Celis E, Pious D: **Defective processing and presentation of exogenous antigens in**

- mutants with normal HLA class II genes.** *Nature* 1990, **343**:71-74.
54. Mellins E, Kempin S, Smith L, Monji T, Pious D: **A gene required for class II-restricted antigen presentation maps to the major histocompatibility complex.** *J.Exp.Med.* 1991, **174**:1607-1615.
55. Riberdy JM, Cresswell P: **The antigen-processing mutant T2 suggest a role for MHC-linked genes in class II antigen presentation.** *J.Immunol.* 1992, **148**:2586-2590.
56. Fling SP, Arp B, Pious D: **HLA-DM and -DMB genes are both required for complex formation in antigen-presenting cells.** *Nature* 1994, **368**:554-558.
57. Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C, Monaco JJ, Mellins E: **An essential role for the HLA-DM in antigen presentation by MHC class II major histocompatibility molecules .** *Nature* 1994, **368**:551-554.
58. Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee H-G, Coligan JE, Martin R: **Ligand motifs of HLA-DRB5\*0101 and DRB1\*1501 molecules delineated from self-peptides.** *J.Immunol.* 1994, **153**:1665-1673.
59. Cho S, Attaya M, Monaco JJ: **New class II-like genes in the murine MHC.** *Nature* 1991, **353**:573-576.
60. Kelly AP, Monaco JJ, Cho S, Trowsdale J: **A new human HLA class II-related locus, DM.** *Nature* 1991, **353**:571-573.
61. Fremont DH, Crawford F, Marrack P, Hendrickson WA, Kappler J: **Crystal structure of mouse H2-M.** *Immunity* 1998, **9**:385-393.

62. Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC: **The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation.** *Immunity* 1998, **9**:377-383.
63. Walter W, Loos M, Maeurer MJ: **H2-M polymorphism in mice susceptible to collagen-induced arthritis involves the peptide binding groove.** *Immunogenetics* 1996, **44**:19-26.
64. Peleraux A, Karlsson L, Chambers J, Peterson PA: **Genomic organization of a mouse MHC class II region including the H2-M and Lmp2 loci.** *Immunogenetics* 1996, **43**:204-214.
65. Walter W, Scheuer C, Loos M, Reichert TE, Maeurer MJ: **H2-Mbeta 1 and H2-Mbeta 2 heterodimers equally promote clip removal in I-A(q) molecules from autoimmune-prone DBA/1 mice.** *J.Biol.Chem.* 2001, **276**:11086-11091.
66. Walter W, Loos M, Maeurer MJ: **Differential expression of alternative H2-M isoforms in B cells, dendritic cells and macrophages by proinflammatory cytokines.** *Mol.Immunol.* 1999, **36**:733-743.
67. Karlsson L, Péléraux A, Lindstedt R, Liljedahl M, Peterson PA: **Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells.** *Science* 1994, **266**:1569-1573.
68. Carrington M, Harding A: **Sequence analysis of two novel HLA-DMA alleles.** *Immunogenetics* 1994, **40**:165-165.
69. Sanderson F, Kleijmeer MJ, Kelly A, Verwoerd D, Tulp A, Neeffjes JJ, Geuze HJ, Trowsdale J: **Accumulation of HLA-DM, a regulator of**

- antigen presentation, in MHC class II compartments.** *Science* 1994, **266**:1566-1569.
70. Chang C-H, Flavell RA: **Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation.** *J.Exp.Med.* 1995, **181**:765-767.
71. Westerheide SD, Louis-Pence P, Ping DS, He XF, Boss JM: **HLA-DMA and HLA-DMB gene expression functions through the conserved S-X-Y region.** *J.Immunol.* 1997, **158**:4812-4821.
72. Clausen BE, Waldburger JM, Schwenk F, Barras E, Mach B, Rajewsky K, Forster I, Reith W: **Residual MHC class II expression on mature dendritic cells and activated B cells in RFX5-deficient mice.** *Immunity.* 1998, **8**:143-155.
73. Chang CH, Guerder S, Hong SC, Van Ewijk W, Flavell RA: **Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression.** *Immunity* 1996, **4**:167-178.
74. Fling SP, Rak J, Muczynski KA, Arp B, Pious D: **Novel mutants define genes required for the expression of human histocompatibility leukocyte antigen DM: Evidence for loci on human chromosome 6p.** *J.Exp.Med.* 1997, **186**: 1469-1480.
75. Hermel E, Yuan J, Monaco JJ: **Characterization of polymorphism within the H2-M MHC class II loci.** *Immunogenetics* 1995, **42**:136-142.
76. Hermel E, Han M, Hague B, Kindt T, Monaco JJ: **Isolation and mapping of the rabbit DM genes.** *Immunogenetics* 1999, **49**:295-302.

77. Niimi M, Nakai Y, Aida Y: **Nucleotide sequences and the molecular evolution of the DMA and DMB genes of the bovine major histocompatibility complex.** *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995, **217**:522-528.
78. Copier J, Kleijmeer MJ, Ponnambalam S, Oorschot V, Potter P, Trowsdale J, Kelly A: **Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB.** *J.Immunol.* 1996, **157**:1017-1027.
79. Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcomb C, Cresswell P: **Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells.** *Immunity* 1994, **1**:595-606.
80. Marks MS, Roche PA, van Donselaar E, Woodruff L, Peters PJ, Bonifacino JS: **A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the  $\beta$  chain directs HLA-DM to MHC class II compartments.** *J.Cell Biol.* 1995, **131**:351-369.
81. Pierre P, Denzin LK, Hammond C, Drake JR, Amigorena S, Cresswell P, Mellman I: **HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II-containing endocytic compartments.** *Immunity* 1996, **4**:229-239.
82. Lindstedt R, Liljedahl M, Peleraux A, Peterson PA, Karlsson L: **The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif.** *Immunity* 1995, **3**:561-572.

83. Copier J, Potter P, Sacks SH, Kelly AP: **Multiple signals regulate the intracellular trafficking of HLA-DM in B-lymphoblastoid cells.** *Immunology* 1998, **93**:505-510.
84. Denzin LK, Cresswell P: **HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II  $\alpha\beta$  dimers and facilitates peptide loading.** *Cell* 1995, **82**:155-165.
85. Kropshofer H, Hammerling GJ, Vogt AB: **How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest?** *Immunol.Today* 1997, **18**:77-82.
86. Sanderson F, Thomas C, Neefjes J, Trowsdale J: **Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo.** *Immunity* 1996, **4**:87-96.
87. Arndt SO, Vogt AB, Markovic-Plese S, Martin R, Moldenhauer G, Wolpl A, Sun Y, Schadendorf D, Hammerling GJ, Kropshofer H: **Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells.** *EMBO J.* 2000, **19**:1241-1251.
88. Liu SH, Marks MS, Brodsky FM: **A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway.** *J.Cell Biol.* 1998, **140**:1023-1037.
89. Stang E, Guerra CB, Amaya M, Paterson Y, Bakke O, Mellins ED: **DR/CLIP (class II-associated invariant chain peptides) and DR/peptide complexes colocalize in prelysosomes in human B lymphoblastoid cells.** *J.Immunol.* 1998, **160**:4696-4707.
90. Kropshofer H, Arndt SO, Moldenhauer G, Hammerling GJ, Vogt AB: **HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH.** *Immunity* 1997, **6**:293-302.

91. Sherman MA, Weber DA, Jensen PE: **DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide.** *Immunity* 1995, **3**:197-205.
92. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E, Zaller DM: **Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA- DR.** *Nature* 1995, **375**:802-806.
93. Avva RR, Cresswell P: **In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain derived peptides.** *Immunity* 1994, **1**:763-774.
94. Vogt AB, Kropshofer H, Moldenhauer G, Hammerling GJ: **Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1996, **93**:9724-9729.
95. Brooks AG, Campbell PL, Reynolds P, Gautam AM, McCluskey J: **Antigen presentation and assembly by mouse I-A<sup>k</sup> class II molecules in human APC containing deleted or mutated HLA DM genes.** *J.Immunol.* 1994, **153**:5382-5392.
96. Kropshofer H, Vogt AB, Moldenhauer G, Hammer J, Blum JS, Hammerling GJ: **Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM.** *EMBO J.* 1996, **15**:6144-6154.
97. Stebbins CC, Loss GE, Jr., Elias CG, Chervonsky A, Sant AJ: **The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent.** *J.Exp.Med.* 1995, **181**:223-234.
98. Malcherek G, Gnau V, Jung G, Rammensee H-G, Melms A: **Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides**

**to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules.** *J.Exp.Med.* 1995, **181**:527-536.

99. Kropshofer H, Vogt AB, Stern LJ, Hammerling GJ: **Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules.** *Science* 1995, **270**:1357-1359.
100. Urban RG, Chicz RM, Strominger JL: **Selective release of some invariant chain-derived peptides from HLA-DR1 molecules at endosomal pH.** *J.Exp.Med.* 1994, **180**:751-755.
101. Sette A, Southwood S, Miller J, Appella E: **Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain-derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II.** *J.Exp.Med.* 1995, **181**: 677-683.
102. Tourne S, Miyazaki T, Wolf P, Ploegh H, Benoist C, Mathis D: **Functionality of major histocompatibility complex class II molecules in mice doubly deficient for invariant chain and H-2M complexes.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1997, **94**:9255-9260.
103. Wolf PR, Tourne S, Miyazaki T, Benoist C, Mathis D, Ploegh HL: **The phenotype of H-2M-deficient mice is dependent on the MHC class II molecules expressed.** *Eur.J.Immunol.* 1998, **28**:2605-2618.
104. Kovats S, Whiteley PE, Concannon P, Rudensky AY, Blum JS: **Presentation of abundant endogenous class II DR-restricted antigens by DM-negative B cell lines.** *Eur.J.Immunol.* 1997, **27**:1014-1021.

105. Chou CL, Sadegh-Nasseri S: **HLA-DM recognizes the flexible conformation of major histocompatibility complex class II.** *J.Exp.Med.* 2000, **192**:1697-1706.
106. Sato AK, Zarutskie JA, Rushe MM, Lomakin A, Natarajan SK, Sadegh-Nasseri S, Benedek GB, Stern LJ: **Determinants of the peptide-induced conformational change in the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR1.** *J.Biol.Chem.* 2000, **275**:2165-2173.
107. Van Ham SM, Grueneberg U, Malcherek G, Broeker I, Melms A, Trowsdale J: **Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs.** *J.Exp.Med.* 1996, **184**:2019-2024.
108. Weber DA, Evavold BD, Jensen PE: **Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM.** *Science* 1996, **274**:618-620.
109. Denzin LK, Hammond C, Cresswell P: **HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules.** *J.Exp.Med.* 1996, **184**:2153-2165.
110. Sant AJ, Beeson C, McFarland B, Cao J, Ceman S, Bryant PW, Wu S: **Individual hydrogen bonds play a critical role in MHC class II: peptide interactions: implications for the dynamic aspects of class II trafficking and DM-mediated peptide exchange.** *Immunol.Rev.* 1999, **172**:239-253.
111. Ceman S, Wu S, Jardetzky TS, Sant AJ: **Alteration of a single hydrogen bond between class II molecules and peptide**

- results in rapid degradation of class II molecules after invariant chain removal.** *J.Exp.Med.* 1998, **188**: 2139-2149.
112. Pathak SS, Lich JD, Blum JS: **Cutting edge: editing of recycling class II:peptide complexes by HLA-DM.** *J.Immunol.* 2001, **167**:632-635.
113. Watts C: **Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules.** *Annu.Rev.Immunol.* 1997, **15**:821-850.
114. Pinet V, Malnati MS, Long EO: **Two processing pathways for the MHC class II-restricted presentation of exogenous influenza virus antigen.** *J.Immunol.* 1994, **152**:4852-4860.
115. Pinet V, Vergelli M, Martin R, Bakke O, Long EO: **Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA- DR molecules.** *Nature* 1995, **375**:603-606.
116. Piva TJ, Davern CM, Francis KG, Chojnowski GM, Hall PM, Ellem KA: **Increased ecto-metallopeptidase activity in cells undergoing apoptosis.** *J.Cell Biochem.* 2000, **76**:625-638.
117. Germain RN, Hendrix LR: **MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding.** *Nature* 1991, **353**:134-139.
118. Germain RN, Rinker Jr AG: **Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules.** *Nature* 1993, **363**:725-728.

119. Stern LJ, Wiley DC: **The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty  $\alpha\beta$  heterodimers in the absence of antigenic peptide.** *Cell* 1992, **68**:465-477.
120. Devaux B, Wilson KJ, Aguilar B, Jorgensen B, Rothbard JB: **Differential stability of HLA-DR alleles independent of endogenous peptides.** *J.Immunol.* 1995, **155**:1921-1929.
121. Sadegh-Nasseri S, Germain RN: **A role for peptide in determining MHC class II structure.** *Nature* 1991, **353**:167-170.
122. Monji T, McCormack AL, Yates JR, III, Pious D: **Invariant-cognate peptide exchange restores class II dimer stability in HLA-DM mutants.** *J.Immunol.* 1994, **153**:4468-4477.
123. Kropshofer H, Vogt AB, Thery C, Armandola EA, Li BC, Moldenhauer G, Amigorena S, Hammerling GJ: **A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules.** *EMBO J.* 1998, **17**:2971-2981.
124. Potter PK, Copier J, Sacks SH, Calafat J, Janssen H, Neefjes JJ, Kelly AP: **Accurate intracellular localization of HLA-DM requires correct spacing of a cytoplasmic YTPL targeting motif relative to the transmembrane domain.** *Eur.J.Immunol.* 1999, **29**:3936-3944.
125. Weber DA, Dao CT, Jun J, Wigal JL, Jensen PE: **Transmembrane domain-mediated colocalization of HLA-DM and HLA-DR is required for optimal HLA-DM catalytic activity.** *J.Immunol.* 2001, **167**:5167-5174.

126. Vogt AB, Kropshofer H: **HLA-DM - an endosomal and lysosomal chaperone for the immune system.** *Trends Biochem.Sci.* 1999, **24**:150-154.
127. Martin WD, Hicks GG, Mendiratta SK, Leva HI, Ruley HE, Van Kaer L: **H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection.** *Cell* 1996, **84**:543-550.
128. Miyazaki T, Wolf P, Tourne S, Waltzinger C, Dierich A, Barois N, Ploegh H, Benoist C, Mathis D: **Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway.** *Cell* 1996, **84**:531-541.
129. Bikoff EK, Wutz G, Kenty GA, Koonce CH, Robertson EJ: **Relaxed DM requirements during class II peptide loading and CD4+ T cell maturation in BALB/c mice.** *J.Immunol.* 2001, **166**:5087-5098.
130. Kovats S, Grubin CE, Eastman S, DeRoos P, Dongre A, Van Kaer L, Rudensky AY: **Invariant chain-independent function of H-2M in the formation of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes in vivo.** *J.Exp.Med.* 1998, **187**:245-251.
131. Swier K, Brown DR, Bird JJ, Martin WD, Van Kaer L, Reiner SL: **A critical, invariant chain-independent role for H2-M in antigen presentation.** *J.Immunol.* 1998, **160**:540-544.
132. Inoko H, Ando A, Kimura M, Tsuji K: **Isolation and characterization of the cDNA clone and genomic clones of a**

- new HLA class II antigen heavy chain, DO alpha.** *J.Immunol.* 1985, **135**:2156-2159.
133. Serenius B, Rask L, Peterson PA: **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.* 1987, **262**:8759-8766.
134. Tonnelle C, DeMars R, Long EO: **DO $\beta$ : a new  $\beta$  chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression.** *EMBO J.* 1985, **4**:2839-2847.
135. Trowsdale J, Kelly A: **The human HLA class II alpha chain DZ alpha is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions.** *EMBO J.* 1985, **4**:2231-2237.
136. Trowsdale J, Kelly A: **The Human HLA class II a chain DZa is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions.** *EMBO J.* 1985, **4**:2231-2237.
137. Karlsson L, Surh CD, Sprent J, Peterson PA: **A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution.** *Nature* 1991, **351**:485-488.
138. Douek DC, Altmann DM: **HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression.** *Int.Immunol.* 1997, **9**:355-364.
139. Liljedahl M, Kuwana T, Fung-Leung WP, Jackson M, Peterson PA, Karlsson L: **HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport.** *EMBO J.* 1996, **15**:4817-4824.

140. Samaan A, Thibodeau J, Mahana W, Castellino F, Cazenave PA, Kindt TJ: **Cellular distribution of a mixed MHC class II heterodimer between DR $\alpha$  and a chimeric DO $\beta$  chain.** *Int.Immunol.* 1999, **11**:99-111.
141. Brunet A, Samaan A, Deshaies F, Kindt TJ, Thibodeau J: **Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta.** *J.Biol.Chem.* 2000, **275**:37062-37071.
142. Denzin LK, Sant'Angelo DB, Hammond C, Surman MJ, Cresswell P: **Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing.** *Science* 1997, **278**:106-109.
143. **HLA-DO is a negative regulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading.** *Current Biol.* 1997, **7**:950-957.
144. Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Wong P, Ngo K, Teyton L, Peterson PA, Brunmark A, Rudensky AY, Fung-Leung WP, Karlsson L: **Altered antigen presentation in mice lacking H2-O.** *Immunity* 1998, **8**:233-243.
145. Perraudeau M, Taylor PR, Stauss HJ, Lindstedt R, Bygrave AE, Pappin DJ, Ellmerich S, Whitten A, Rahman D, Canas B, Walport MJ, Botto M, Altmann DM: **Altered major histocompatibility complex class II peptide loading in H2- O-deficient mice.** *Eur.J.Immunol.* 2000, **30**:2871-2880.
146. van Ham M, van Lith M, Lillemeier B, Tjin E, Gruneberg U, Rahman D, Pastoors L, van Meijgaarden K, Roucard C, Trowsdale J, Ottenhoff T, Pappin D, Neefjes J: **Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide**

- repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO.** *J.Exp.Med.* 2000, **191**:1127-1136.
147. Alfonso C, Karlsson L: **Nonclassical MHC class II molecules.** *Annu.Rev.Immunol.* 2000, **18**:113-142.
148. Louis-Pence P, Kerlan-Candon S, Morel J, Combe B, Clot J, Pinet V, Eliaou JF: **The down-regulation of HLA-DM gene expression in rheumatoid arthritis is not related to their promoter polymorphism.** *J.Immunol.* 2000, **165**: 4861-4869.
149. Djilali-Saiah I, Benini V, Schmitz J, Timsit J, Assan R, Boitard C, Bach JF, Caillat-Zucman S: **Absence of primary association between DM gene polymorphism and insulin- dependent diabetes mellitus or celiac disease.** *Hum.Immunol.* 1996, **49**:22-27.
150. Kim TG, Carrington M, Choi HB, Kim HY, Han H: **Three HLA-DMB variants in Korean patients with autoimmune diseases.** *Hum.Immunol.* 1996, **46**:58-60.
151. Ishihara M, Naruse T, Ohno S, Kawata H, Mizuki N, Yamagata N, Ishida T, Nose Y, Inoko H: **Analysis of HLA-DM polymorphisms in sarcoidosis.** *Hum.Immunol.* 1996, **49**:144-146.
152. Pinet V, Combe B, Avinens O, Caillat-Zucman S, Sany J, Clot J, Eliaou JF: **Polymorphism of the HLA-DMA and DMB genes in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* 1997, **40**:854-858.
153. Moxley G, Han J: **HLA DMA and DMB show no association with rheumatoid arthritis in US Caucasians.** *Eur.J.Immunogenet.* 2001, **28**:539-543.

154. Cucchi-Mouillot P, Lai S, Carcassi C, Sorba P, Stuart-Simoni M, Amoros JP, Genetet B, Haras D, Contu L: **Implication of HLA-DMA alleles in corsican IDDM.** *Dis.Markers* 1998, **14**:135-141.
155. Raddrizzani L, Bono E, Vogt AB, Kropshofer H, Gallazzi F, Sturniolo T, Hammerling GJ, Sinigaglia F, Hammer J: **Identification of destabilizing residues in HLA class II-selected bacteriophage display libraries edited by HLA-DM.** *Eur.J.Immunol.* 1999, **29**:660-668.
156. Patil NS, Hall FC, Drover S, Spurrell DR, Bos E, Cope AP, Sonderstrup G, Mellins ED: **Autoantigenic HCgp39 epitopes are presented by the HLA-DM-dependent presentation pathway in human B cells.** *J.Immunol.* 2001, **166**: 33-41.
157. Kasai M, Hirokawa K, Kajino K, Ogasawara K, Tatsumi M, Hermel E, Monaco JJ, Mizuochi T: **Difference in antigen presentation pathways between cortical and medullary thymic epithelial cells.** *Eur.J.Immunol.* 1996, **26**:2101-2107.
158. Kasai M, Kominami E, Mizuochi T: **The antigen presentation pathway in medullary thymic epithelial cells, but not that in cortical thymic epithelial cells, conforms to the endocytic pathway.** *Eur.J.Immunol.* 1998, **28**:1867-1876.
159. Marten A, Ziske C, Schottker B, Weineck S, Renoth S, Buttgerit P, Schakowski F, Konig S, von Rucker A, Allera A, Schroers R, Sauerbruch T, Wittig B, Schmidt-Wolf IG: **Transfection of dendritic cells (DCs) with the CIITA gene: increase in immunostimulatory activity of DCs.** *Cancer Gene Ther.* 2001, **8**:211-219.

160. Bustin SA, Li SR, Phillips S, Dorudi S: **Expression of HLA class II in colorectal cancer: evidence for enhanced immunogenicity of microsatellite-instability-positive tumours.** *Tumour.Biol.* 2001, **22**:294-298.
161. Tomazin R, Boname J, Hegde NR, Lewinsohn DM, Altschuler Y, Jones TR, Cresswell P, Nelson JA, Riddell SR, Johnson DC: **Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells.** *Nat.Med.* 1999, **5**:1039-1043.
162. Guerra CB, Busch R, Doebele RC, Liu W, Sawada T, Kwok WW, Chang MD, Mellins ED: **Novel glycosylation of HLA-DRalpha disrupts antigen presentation without altering endosomal localization.** *J.Immunol.* 1998, **160**:4289-4297.
163. Mellins E, Cameron P, Amaya M, Goodman S, Pious D, Smith L, Arp B: **A mutant human histocompatibility leukocyte antigen DR molecule associated with invariant chain peptides.** *J.Exp.Med.* 1994, **179**:541-549.
164. Doebele CR, Busch R, Scott MH, Pashine A, Mellins DE: **Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules.** *Immunity.* 2000, **13**:517-527.
165. Busch R, Doebele RC, Von Scheven E, Fahrni J, Mellins ED: **Aberrant intermolecular disulfide bonding in a mutant HLA-DM molecule: implications for assembly, maturation, and function.** *J.Immunol.* 1998, **160**:734-743.
166. Hammond C, Denzin LK, Pan M, Griffith JM, Geuze HJ, Cresswell P: **The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II**

**compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules.** *J.Immunol.* 1998, **161**:3282-3291.

167. Busch R, Reich Z, Zaller DM, Sloan V, Mellins ED: **Secondary structure composition and pH-dependent conformational changes of soluble recombinant HLA-DM.** *J.Biol.Chem.* 1998, **273**:27557-27564.
168. Ullrich HJ, Doring K, Grueneberg U, Jaehnig F, Trowsdale J, Van Ham MS: **Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH.** *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1997, **94**:13163-13168.
169. Boniface JJ, Lyons DS, Wettstein DA, Allbritton NL, Davis MM: **Evidence for a conformational change in a class II major histocompatibility complex molecule occurring in the same pH range where antigen binding is enhanced.** *J.Exp.Med.* 1996, **183**:119-126.
170. Runnels HA, Moore JC, Jensen PE: **A structural transition in class II major histocompatibility complex proteins at mildly acidic pH.** *J.Exp.Med.* 1996, **183**:127-136.
171. Faubert A, Samaan A, Thibodeau J: **Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM.** *J.Biol.Chem.* 2002, **277**:2750-2755.
172. Albert LJ, Ghumman B, Watts TH: **Effect of HLA-DM transfection on hen egg lysozyme presentation by T2.Ak cells .** *J.Immunol.* 1996, **157**:2247-2255.
173. Gautam AM, Yang M, Milburn PJ, Baker R, Bhatnagar A, McCluskey J, Boston T: **Identification of residues in the class II-associated**

**Ii peptide (CLIP) region of invariant chain that affect efficiency of MHC class II-mediated antigen presentation in an allele-dependent manner.** *J.Immunol.* 1997, **159**: 2782-2788.

174. Boniface JJ, Lyons DS, Wettstein DA, Allbritton NL, Davis MM: **Evidence for a conformational change in a class II major histocompatibility complex molecule occurring in the same pH range where antigen binding is enhanced.** *J.Exp.Med.* 1996, **183**:119-126.
175. Runnels HA, Moore JC, Jensen PE: **A structural transition in class II major histocompatibility complex proteins at mildly acidic pH.** *J.Exp.Med.* 1996, **183**:127-136.
176. Dornmair K, Rothenhausler B, McConnell HM: **Structural intermediates in the reactions of antigenic peptides with MHC molecules.** *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 1989, **54 Pt 1**:409-416.
177. Bell JI, Denny DW, Jr., McDevitt HO: **Structure and polymorphism of murine and human class II major histocompatibility antigens.** *Immunol.Rev.* 1985, **84**:51-71.
178. Jensen T, Galli-Stampino L, Mouritsen S, Frische K, Peters S, Meldal M, Werdelin O: **T cell recognition of Tn-glycosylated peptide antigens.** *Eur.J.Immunol.* 1996, **26**:1342-1349.
179. McFarland BJ, Beeson C, Sant AJ: **Cutting edge: a single, essential hydrogen bond controls the stability of peptide-MHC class II complexes.** *J.Immunol.* 1999, **163**:3567-3571.
180. Kleijmeer M, Ramm G, Schuurhuis D, Griffith J, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P, Rudensky AY, Ossendorp F, Melief CJ,

Stoorvogel W, Geuze HJ: **Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells.**

*J Cell Biol.* 2001, **155**:53-63.

181. Ladanyi A, Nishimura MI, Rosenberg SA, Yang JC: **Tumorigenicity and immunogenicity of murine tumor cells expressing an MHC class II molecule with a covalently bound antigenic peptide.** *J Immunother.* 2000, **23**: 36-47.

182. [www-biology.ucsd.edu/classes/bild36.FA00/lecture\\_11\\_00.html](http://www-biology.ucsd.edu/classes/bild36.FA00/lecture_11_00.html)

183. [www-anl.gov/OPA/news99/news991203.html](http://www-anl.gov/OPA/news99/news991203.html)

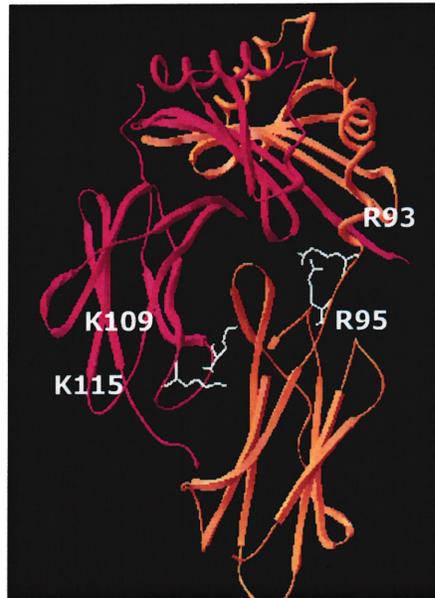
184. [www.anl.gov/OPA/news99/news991203.html](http://www.anl.gov/OPA/news99/news991203.html)

184. Paul, W.E., **Fundamental Immunology**, 4th ed, Philadelphia, Pa, Lippincott-Raven Publishers, 1999, 1589 p.

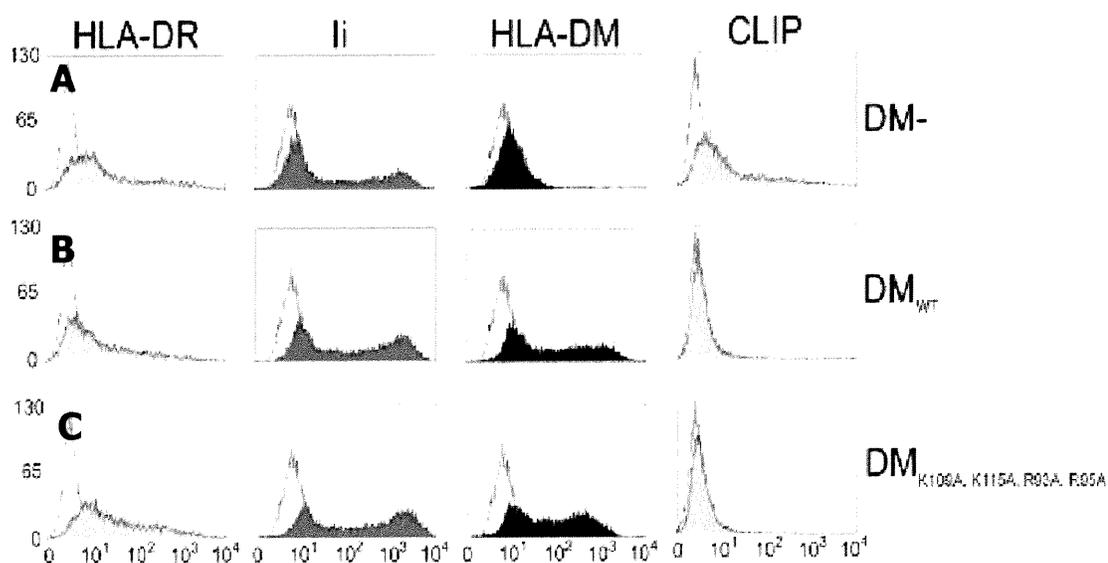
185. [depts.washington.edu](http://depts.washington.edu)

186. [www.class.fst.ohio-state.edu/FST822/lectures/hydro.html](http://www.class.fst.ohio-state.edu/FST822/lectures/hydro.html)

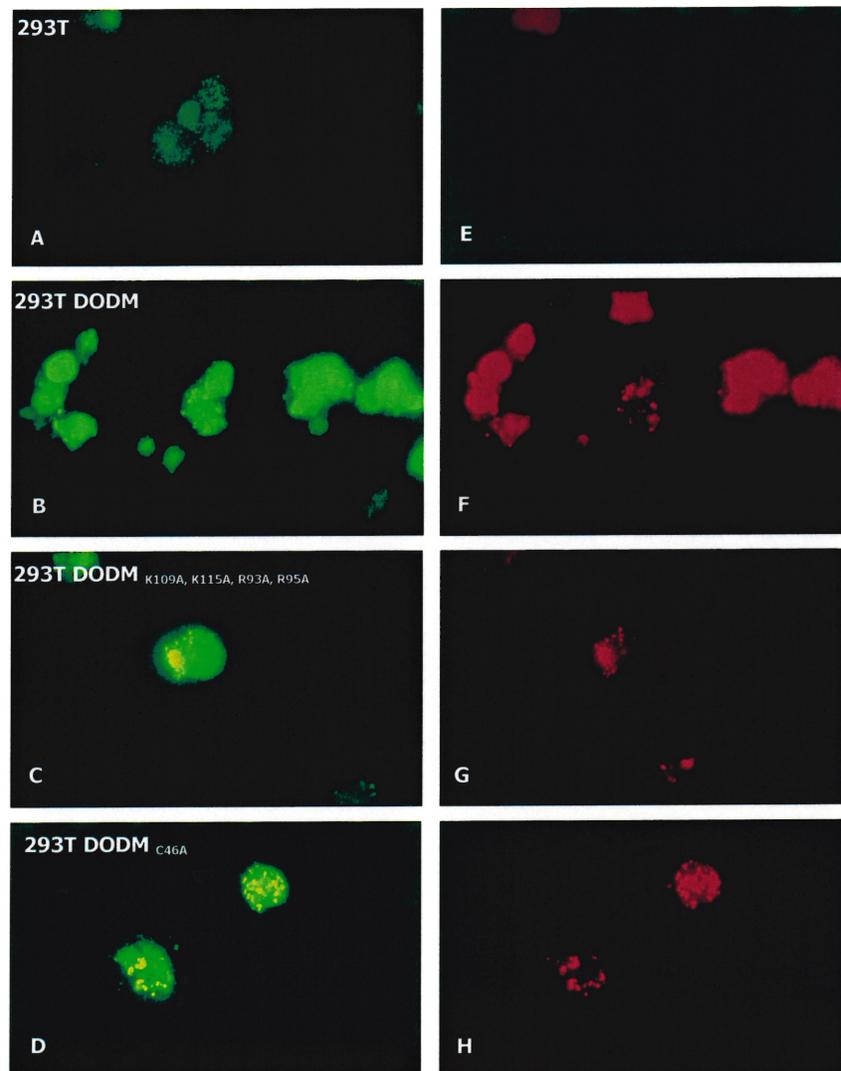
# APPENDICES

**FIGURE A.1.**

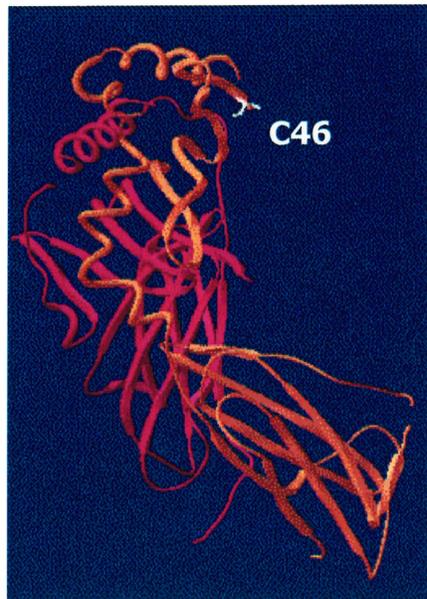
**La position des mutations de charge effectuées sur HLA-DM.** En rouge la chaîne  $\alpha$ , les résidus mutés K109, K115 (blanc) et en orangé la chaîne  $\beta$ , les résidus mutés R93 et R95 (blanc). Les numéros d'accèsion sont NM\_006120 pour DM $\alpha$  et NM\_002118 pour DM $\beta$  (orange) (10). Le modèle moléculaire a été réalisé à l'aide de la banque de données protéiques numéro 1HDM et analysé par *Swiss PDB Viewer* (19). Les mutations dans les ADNc de DM $\alpha$  et de DM $\beta$  ont été introduites par la technique de *PCR overlap extension*, à l'aide des amorces mutagéniques (DM $\alpha$ K109A/*NheI*; 5'-GTTACGCTAGCGCCCCTGGAG-3', DM $\alpha$ K115A/*ApaI*; 5'-GGAGTTTGGGGCCCCCAAAC-3', DM $\beta$ R93A/R95A/*KasI*; 5'-CTGACCAACGCGACGGCGCCACCATC-3') ainsi qu'avec les amorces *universal* (DM $\alpha$ ) et *reverse* (DM $\beta$ ). Les produits ont été subséquemment subclonés dans les sites *StuI* de pBSDM $\alpha$  et *Eco4VII-HindIII* (R93A et R95A) de pBSDM $\beta$ , remplaçant ainsi le fragment de type sauvage par celui contenant la mutation appropriée. La séquence nucléique a été confirmée par le séquençage de l'ADN en utilisant la T7 polymérase. Les ADNc mutants ont été introduits dans le vecteur pBudCe4-A dans les sites *NotI-XhoI* (pBSDM $\alpha$ ) et *SalI-XbaI* (pBSDM $\beta$ ).

**FIGURE A.2.**

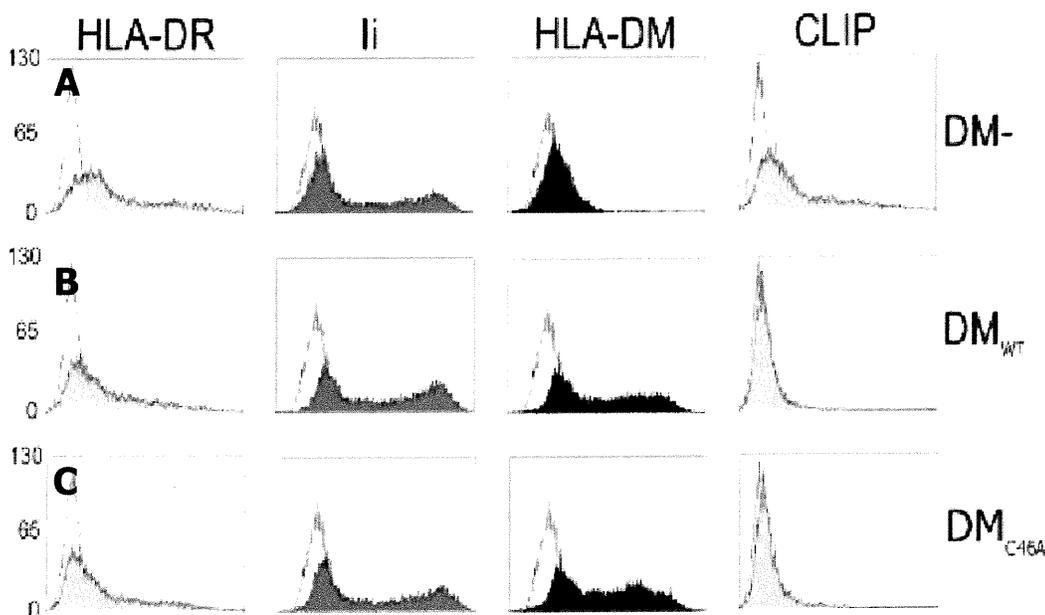
**Les mutations de charges K109A, K115A, R93A et R95A n'affectent pas la catalyse de CLIP par HLA-DM.** Les cellules 293T ont été cotransfectées de façon transitoire, à l'aide de la technique de précipitation au calcium phosphate en utilisant 4ug de chacun des ADN. Les vecteurs pBudCe4-A contenant les ADN appropriés de DR, la chaîne invariante avec (B) ou sans DM (A) de type sauvage ou muté en position K109, K115, R93 et R95 (C) ont été utilisés pour transfecter  $1.5 \times 10^6$  cellules. Après une incubation de 48 heures, les cellules ont été analysées pour l'expression de HLA-DR (L243 anticorps conformationnel) et de CLIP (Cer-CLIP) en surface. La chaîne invariante (BU45) et HLA-DM (MaP.DM1) ont été colorés de façon intracellulaire.

**FIGURE A.3.**

**Les mutants K109A, K115A, R93A, R95A et C46A sortent du réticulum endoplasmique et s'associent à HLA-DO.** Des cellules 293T ont été cotransfectées avec ou sans HLA-DO et avec (B, F) ou sans HLA-DM (A, E) de type sauvage, muté en position K109, K115, R93 et R95 (C, G) ou en position C46 (D, H). Ces transfectants ont été analysés pour la localisation de HLA-DM (Anti-DM $\beta$ ) (A-D) et de HLA-DO (Anti-DO $\alpha$ ) (E-H).

**FIGURE A.4.**

**La position de la cystéine libre mutée sur HLA-DM.** En rouge, la chaîne  $\alpha$  et en orangé la chaîne  $\beta$  et le résidu muté C46 (blanc). Les numéros d'accèsion sont NM\_006120 pour DM $\alpha$  et NM\_002118 pour DM $\beta$  (orange) (10). Le modèle moléculaire a été réalisé à l'aide de la banque de données protéiques numéro 1HDM et analysé par *Swiss PDB Viewer* (19). La mutation dans l'ADNc de DM $\beta$  a été introduite par la technique du *PCR overlap extension*, à l'aide de l'amorce mutagénique (DM $\beta$ C46A; 5'-ATG GCC CCT GCA GAA TTT GGG-3') ainsi qu'avec l'amorce *reverse*. Le produit a été subséquemment subcloné dans le site *ClaI-Eco47III* de pBSDM $\beta$ , remplaçant ainsi le fragment de type sauvage par celui contenant la mutation appropriée. La séquence nucléique a été confirmée par le séquençage de l'ADN en utilisant la T7 polymérase. L'ADNc mutant et de type sauvage ont été introduits dans le vecteur pBudCe4-A dans les sites *NotI-XhoI* (pBSDM $\alpha$ ) et *SaI-XbaI* (pBSDM $\beta$ ).

**FIGURE A.5.**

**La mutation de la cystéine libre n'affecte pas la catalyse de CLIP par HLA-DM.** Les cellules 293T ont été cotransfectées de façon transitoire, à l'aide de la technique de précipitation au calcium phosphate en utilisant 4ug de chacun des ADN. Les vecteurs pBudCe4-A contenant les ADN appropriés de DR, la chaîne invariante avec (B) ou sans DM (A) de type sauvage ou muté (C) en position C46 ont été utilisés pour transfecter  $1.5 \times 10^6$  cellules. Après une incubation de 48 heures, ces transfectants ont été analysés pour l'expression de HLA-DR (L243 anticorps conformationnel) et de CLIP (Cer-CLIP) en surface. La chaîne invariante (BU45) et HLA-DM (Map.DM1) ont été colorés de façon intracellulaire.

**FIGURE A.6.**

<b>Position</b>	<b>Emplacement</b>	<b>Exposition</b>
F18	Feuillet $\beta$	Non
Y23	Feuillet $\beta$	Non
Y37	Feuillet $\beta$	Non
F43	Feuillet $\beta$	Non
F45	Feuillet $\beta$	Non*
F47	Feuillet $\beta$	Non*
F59	Fin Feuillet $\beta$ début hélice $\alpha$	Non
I72	Hélice $\alpha$	Non*
F74	Hélice $\alpha$	Non*
F78	Hélice $\alpha$	Non*
<b>I94</b>	<b>Fin Hélice <math>\alpha</math></b>	<b>Oui</b>
<b>F106</b>	<b>Domaine <math>\alpha 2</math></b>	<b>Oui</b>
F113	Domaine $\alpha 2$	Non
<b>F122</b>	<b>Domaine <math>\alpha 2</math></b>	<b>Oui</b>
F127	Domaine $\alpha 2$	Non
W135	Domaine $\alpha 2$	Non
F158	Domaine $\alpha 2$	Non
F161	Domaine $\alpha 2$	Non
Y163	Domaine $\alpha 2$	Non
F174	Domaine $\alpha 2$	Non
I182	Domaine $\alpha 2$	Non
<b>Y185</b>	<b>Domaine <math>\alpha 2</math></b>	<b>Oui</b>
<b>Y190</b>	<b>Domaine <math>\alpha 2</math></b>	<b>Oui</b>
W191	Domaine $\alpha 2$	Non

**Les résidus hydrophobes (I, F, W, Y) conservés dans la portion luminale de la protéine mature HLA-DM $\alpha$ .** Le tableau nous indique la position des résidus, leur emplacement sur la molécule et leur exposition. Les résidus I94, F106, F122, Y185 et Y190 (gras) ont été identifiés comme étant exposés sur la structure cristalline humaine de la molécule HLA-DM à l'aide du programme spdbv. Les étoiles (\*) indiquent une orientation vers le haut.

**FIGURE A.7.**

<b>Position</b>	<b>Emplacement</b>	<b>Exposition</b>
F3	Feuillet $\beta$	Non
F22	Feuillet $\beta$	Non
Y24	Feuillet $\beta$	Non*
F28	Feuillet $\beta$	Non*
W36	Feuillet $\beta$	Non
F86	Hélice $\alpha$	Non
W87	Hélice $\alpha$	Non
F107	Domaine $\beta 2$	Non
Y118	Domaine $\beta 2$	Non
F122	Domaine $\beta 2$	Non
<b>Y123</b>	<b>Domaine <math>\beta 2</math></b>	<b>Oui</b>
W131	Domaine $\beta 2$	Non
<b>W154</b>	<b>Domaine <math>\beta 2</math></b>	<b>Oui</b>
Y156	Domaine $\beta 2$	Non
Y166	Domaine $\beta 2$	Non
Y172	Domaine $\beta 2$	Non
I185	Domaine $\beta 2$	Non
W189	Domaine $\beta 2$	Non

**Les résidus hydrophobes (I, F, W, Y) conservés dans la portion lumineuse de la protéine mature HLA-DM $\beta$ .** Le tableau nous indique la position des résidus, leur emplacement sur la molécule et leur exposition. Les résidus Y123 et W154 (gras) ont été identifiés comme étant exposés sur la structure cristalline humaine de la molécule HLA-DM à l'aide du programme spdbv. Les étoiles (\*) indiquent une orientation vers le haut.

**FIGURE A.8.**

<b>Position</b>	<b>Emplacement</b>	<b>Exposition</b>
H16	Feuillet $\beta$	Non
H20	Feuillet $\beta$	Non
R52	Feuillet $\beta$	Non
<b>R55</b>	<b>Fin feuillet <math>\beta</math> début hélice <math>\alpha</math></b>	<b>Oui</b>
K76	Hélice $\alpha$	Non
R98	Domaine $\alpha 2$	Non
H180	Domaine $\alpha 2$	Non

**Les résidus chargés positivement conservés dans la portion lumineuse de la protéine mature HLA-DM $\alpha$ .** Le tableau nous indique la position des résidus, leur emplacement sur la molécule et leur exposition. Le résidu R55 (gras) a été identifié comme étant exposé sur la structure cristalline humaine de la molécule HLA-DM à l'aide du programme spdbv.

**FIGURE A.9.**

<b>Position</b>	<b>Emplacement</b>	<b>Exposition</b>
H6	Feuillet $\beta$	Non
<b>K30</b>	<b>Feuillet <math>\beta</math></b>	<b>Oui</b>
R71	Hélice $\alpha$	Non
H82	Hélice $\alpha$	Non
R110	Domaine $\beta 2$	Non
K133	Domaine $\beta 2$	Non
<b>H141</b>	<b>Domaine <math>\beta 2</math></b>	<b>Oui</b>
K146	Domaine $\beta 2$	Non
H178	Domaine $\beta 2$	Non

**Les résidus chargés positivement conservés dans la portion lumineuse de la protéine mature HLA-DM $\beta$ .** Le tableau nous indique la position des résidus, leur emplacement sur la molécule et leur exposition. Les résidus K30 et H141 (gras) ont été identifiés comme étant exposés sur la structure cristalline humaine de la molécule HLA-DM à l'aide du programme spdbv.

# REMERCIEMENTS

Je tiens personnellement à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jacques Thibodeau, pour son soutien moral et technique, pour son temps investi dans mes études et pour cette première chance accordée.

J'aimerais aussi souligner l'aide de mes précieux collègues et entre autres celle de Francis Deshaies, qui m'a enseignée l'art de la science dans mes tous débuts. Merci aussi à Alexandre Brunet, à qui j'ai pu me confier et qui a su me comprendre. Finalement, je remercie Georges Azar pour ses sourires, Hayssam Khalil pour son art informatique et Angélique Bellemare-Pelletier pour son support féminin.

Merci à Maman et à Papa, qui m'ont supportée et encouragée, qui à tous les égards ont été fiers de moi. Merci à toi Alexandre pour avoir cru en moi.

Un dernier mot à tous mes amis ou camarades de classe avec qui j'ai étudié ou discuté science dans le passé et qui ont fait en sorte que mon cheminement académique emprunte cette voie.

**Mille Mercis...**