

Université de Montréal

**Impact de l'expression de l'isoforme p35 de la chaîne  
invariante humaine chez des souris déficientes en CD74  
endogène**

par

Laetitia Genève

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D.)  
en microbiologie et immunologie

Mars, 2013

© Laetitia Genève, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Impact de l'expression de l'isoforme p35 de la chaîne  
invariante humaine chez des souris déficientes en CD74  
endogène**

Présentée par :

Laetitia Genève

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Laurent Sabbagh, président-rapporteur

Dr Jacques Thibodeau, directeur de recherche

Dr Javier Di Noia, membre du jury

Dre Sylvie Fournier, examinatrice externe

Dr André Tremblay, représentant du doyen de la FES

## Résumé

La chaîne invariante (li ; CD74) est une protéine membranaire de type II qui joue un rôle majeur dans la présentation antigénique. Dans le réticulum endoplasmique (RE), li favorise l'assemblage du CMH II et prévient la liaison indésirable de polypeptides. Grâce à son motif di-leucine, la chaîne invariante cible le CMH II dans les endosomes. Une fois dans ces compartiments acides, li est dégradé, permettant la liaison de peptides de forte affinité qui seront ensuite présentés aux cellules T CD4+. Chez les souris déficientes en li murin (mli), le CMH II présente une conformation non compacte typique des molécules vides ou liées faiblement à un peptide. Le transport du CMH II est aberrant ce qui conduit à une réduction de son expression en surface ainsi qu'à un défaut de présentation antigénique. De plus, li diversifie le répertoire de peptides et assure la sélection thymique des cellules T CD4+. Enfin, il a un rôle dans la maturation des cellules B et les souris déficientes en li présentent des nombres réduits de cellules B matures folliculaires (FO). L'isoforme mineure humaine p35 (lip35) n'existe pas chez la souris et possède une extension cytoplasmique de 16 acides aminés contenant un motif R-x-R de rétention dans le RE. La sortie du RE est conditionnelle à la liaison du CMH II qui permet de masquer le motif de rétention. lip35 agit comme dominant et impose la rétention aux autres isoformes d'li.

Cependant, le rôle physiologique du motif R-x-R et, plus globalement, celui d'lip35, demeurent nébuleux. Pour mieux cerner la fonction d'lip35, nous avons générée des souris transgéniques (Tg) exprimant l'isoforme humaine lip35 et avons analysé la conformation et le trafic du CMH II, la sélection thymique et la maturation des cellules B ainsi que la présentation antigénique.

Nos résultats ont démontré qu'lip35 favorise l'assemblage du CMH II dans le RE. Il induit également une conformation compacte du CMH II et augmente l'expression du CMH II en surface. De plus, lip35 cible le CMH II dans les endosomes où un peptide de

forte affinité se lie dans la niche peptidique. Par ailleurs, lip35 diversifie le répertoire de peptides et rétablit totalement la sélection des cellules T CD4+ ainsi que le niveau d'expression du TCR de ces dernières. lip35 restaure également la présentation antigénique de l'ovalbumine dont la présentation requiert l'expression d'Ii. Par contre, lip35 rétablit la présentation des superantigènes mais à un niveau moindre que celui des souris sauvages. Ensuite, lip35 permet le rétablissement de la sélection des cellules iNKT démontrant qu'il assiste la présentation des lipides par les molécules CD1d. Enfin, les résultats ont démontré qu'lip35 restaure le développement des cellules B matures folliculaires (FO) mais pas celui des cellules B de la zone marginale. Ceci suggère qu'lip35 est capable d'induire le développement des cellules FO sans stimulation préalable par le MIF (*macrophage migration inhibitory factor*).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre qu'lip35 est fonctionnel et assure la majorité des fonctions d'Ii. Cependant, lip35 ne remplace pas mli endogène concernant la maturation des cellules B MZ suggérant qu'il pourrait avoir un rôle de régulateur.

**Mots-clés :** lip35, CD74, chaîne invariante, présentation antigénique, CMH II, souris transgéniques, motif R-x-R, sélection thymique, développement des cellules B.

## Abstract

The invariant chain (li; CD74) is a type II membrane protein which plays a key role in antigen presentation as well as acting as a receptor for the cytokine MIF (macrophage migration inhibitory factor). In the endoplasmic reticulum (ER), li assists the folding of MHC II and prevents the loading of nascent polypeptides in the peptide-binding groove. Di-leucine-like motifs contained in the li cytoplasmic tail target the MHC II-li complexes in the endocytic pathway. Once in low pH-endosomes, li is degraded allowing the binding of a high affinity peptide which is then presented on cell surface to CD4+ T cells. In li deficient mice, MHC II displays a “floppy” conformation typical of empty molecules or is loosely bound with peptides. The transport is aberrant leading to decreased surface expression of MHC II and defective antigenic presentation. Also, the lack of li restricts the peptide repertoire and impairs thymic selection of CD4+ T cells. Moreover, li regulates B cells maturation and li deficient mice display reduced numbers of mature follicular B cells (FO). The human minor p35 isoform (lip35) does not exist in mice and displays a 16 amino acids N-terminal cytoplasmic extension containing a di-arginine (R-x-R) motif causing ER retention and acting as dominant in heterotrimeric complexes with lip33. Upon binding to MHC II, the retention motif is masked, which allows the complexes to egress from the ER.

The physiological role of the R-x-R motif is poorly understood. To shed light on lip35 function, we generated transgenic mice expressing lip35 and analyzed the conformation and traffic of MHC II, the thymic selection and the development of B cells as well as the antigenic presentation.

Our results showed that lip35 generates an MHC II in the right conformation and increases MHC II surface expression. Also, lip35 targets MHC II into endosomes where high affinity peptides bind to the groove. We also showed that lip35 diversifies the peptide repertoire and fully restores thymic selection of CD4+ T cells as well as the TCR levels on these cells. Then, lip35 ensures presentation of the li-dependent antigen

ovalbumin but does not totally rescue the presentation of superantigens. Interestingly, thymic selection of the iNKT cells is fully restored showing that lip35 assists with lipids presentation by CD1d. Finally, lip35 allows B cells to develop into FO B cells but does not support marginal zone (MZ) B cells maturation. This result suggests that MIF stimulation is not a prerequisite for FO B cells development.

Altogether, these results showed that lip35 is functional and has most of the CD74 functions. However, it cannot replace the endogenous Ii regarding the MZ B cells maturation suggesting that lip35 could have regulatory functions by modulating the development of some cells.

**Keywords:** lip35, CD74, antigenic presentation, MHC II, transgenic mice, R-x-R motif, thymic selection, B cells development.

## Table des matières

Chapitre 1. Revue de Littérature .....	1
1.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) .....	1
1.1.1. Le CMH de classe I.....	2
1.1.2. Le CMH de classe II.....	3
1.1.2.1. Les gènes du CMH de classe II .....	3
1.1.2.2. La régulation de l'expression du CMH de classe II .....	5
1.1.2.3. La structure des molécules du CMH II.....	7
1.2. La présentation antigénique.....	10
1.2.1. La présentation par le CMH de classe I.....	10
1.2.2. La présentation par le CMH de classe II .....	12
1.2.3. La présentation croisée .....	14
1.2.4. La présentation des lipides par les molécules CD1 .....	15
1.3. La chaîne invariante.....	16
1.3.1. Les gènes de la chaîne invariante et la régulation de l'expression.....	16
1.3.2. Structure de la chaîne invariante .....	17
1.3.3. Synthèse et assemblage de la chaîne invariante avec le CMH II .....	20
1.3.4. Rôles de la chaîne invariante dans le RE.....	22
1.3.4.1. Rôle de chaperon .....	22
1.3.4.2. Prévention de la liaison indésirable de polypeptides.....	23
1.3.4.3. Sortie du réticulum endoplasmique .....	23
1.3.5. Oligomérisation de la chaîne invariante .....	24
1.3.6. Modifications post-traductionnelles de la chaîne invariante .....	25
1.3.7. Trafic intracellulaire vers les endosomes .....	26
1.3.8. Protéolyse de la chaîne invariante dans les endosomes.....	28
1.3.9. Régulation de la protéolyse par l'isoforme Iip41 .....	31
1.3.10. Les rôles de la chaîne invariante reliés au CMH II .....	32
1.3.11. Les rôles de la chaîne invariante indépendants du CMH II.....	33

1.3.11.1.	Le rôle d'Ii comme récepteur du MIF .....	33
1.3.11.2.	Le rôle d'Ii comme partenaire de CXCR2 et CXCR4.....	35
1.3.11.3.	Le rôle d'Ii dans la maturation des cellules B .....	36
1.3.11.4.	Le rôle d'Ii dans l'inflammation et les cancers .....	40
1.3.11.5.	Le rôle d'Ii comme récepteur de <i>Helicobacter pylori</i> .....	41
1.3.11.6.	Le rôle d'Ii comme chaperon de HLA-DM.....	41
1.3.11.7.	Le rôle d'Ii dans la mobilité des DC.....	42
1.3.11.8.	Le rôle d'Ii comme cible du VIH .....	42
1.3.12.	Le cas particulier de l'isoforme Iip35.....	43
1.4.	Hypothèses et objectifs.....	46
Chapitre 2.	Résultats de l'article n°1 .....	48
2.1.	Contribution des auteurs.....	48
2.2.	The p35 human invariant chain in transgenic mice restores mature B-cells in the absence of endogenous CD74.....	48
2.3.	Abstract.....	49
2.4.	Introduction .....	50
2.5.	Methods .....	53
2.6.	Results .....	55
2.7.	Discussion.....	66
2.8.	Funding.....	70
2.9.	Acknowledgements .....	70
2.10.	Abbreviations .....	71
2.11.	References .....	71
2.12.	Figure legends .....	75
2.13.	Figures .....	80
2.14.	Supplementary data .....	89
Chapitre 3.	Résultats de l'article n°2.....	91
3.1.	Contribution des auteurs.....	91

3.2. Human invariant chain isoform p35 restores thymic selection and antigen presentation in CD74-deficient mice .....	91
3.3. Abstract.....	92
3.4. Introduction .....	93
3.5. Results .....	94
3.6. Discussion.....	98
3.7. Methods .....	101
3.8. Acknowledgements .....	104
3.9. References .....	105
3.10. Figure legends .....	108
3.11. Figures .....	110
Chapitre 4. Discussion.....	114
4.1. Génération et caractérisation des souris Tg exprimant Iip35 .....	114
4.2. Le rôle d'Iip35 sur la conformation et le trafic intracellulaire du CMH II .....	117
4.3. La rétention d'Iip35 dans le RE dans une population de cellules B .....	118
4.4. Le rôle d'Iip35 dans le développement des cellules B .....	120
4.5. L'impact d'Iip35 sur la fonction des cellules B .....	124
4.6. Le rôle d'Iip35 dans le développement des cellules T .....	125
4.7. Le rôle d'Iip35 dans la présentation antigénique.....	128
4.8. Perspectives .....	128
4.8.1. Le rôle d'Ii comme molécule clé de la signalisation par les cytokines .....	128
4.8.2. Le rôle d'Ii comme récepteur d'adhésion des bactéries .....	129
4.8.3. Le rôle d'Iip35 sur la mobilité des DC .....	130
4.8.4. Le rôle d'Iip35 dans l'infection par le VIH .....	131
Chapitre 5. Conclusion .....	132
Bibliographie .....	134
Annexe 1 : Article non discuté dans cette thèse .....	xvi

## Liste des figures

Figure 1-1 : Organisation des gènes du CMH chez l'humain et la souris.....	2
Figure 1-2 : Structure des molécules du CMH II chez l'humain.....	4
Figure 1-3 : Le contrôle de la transcription du CMH II .....	6
Figure 1-4 : Structure du CMH de classe II .....	8
Figure 1-5 : La structure tridimensionnelle de la niche peptide.....	9
Figure 1-6 : La présentation antigénique par le CMH de classe II.....	13
Figure 1-7 : Épissage et traduction alternatifs de l'ARNm de la chaîne invariante conduisant aux quatre isoformes.....	18
Figure 1-8 : Structure de la chaîne invariante.....	19
Figure 1-9 : Modèle d'un trimère de chaîne invariante.....	20
Figure 1-10 : Schématisation du complexe Ii-CMH II.....	21
Figure 1-11 : Modélisation moléculaire d'un complexe Ii-CMH II pentamérique.....	25
Figure 1-12 : Dégradation séquentielle d'Ii.....	29
Figure 1-13 : Voie de signalisation induite par la liaison de MIF sur le complexe CD74/CD44.....	35
Figure 1-14 : Induction de la survie des cellules B via plusieurs cytokines et CD74.....	39
Figure 1-15 : Extension de la queue cytoplasmique d'Iip35.....	44
Figure 2-1 : Expression of Iip35 in APCs.....	80
Figure 2-2 : Interaction of Iip35 with murine Ii and MHC II molecules.....	81
Figure 2-3 : Iip35 chaperones I-A <sup>b</sup> .....	82
Figure 2-4 : Iip35 increases MHC II surface expression.....	83
Figure 2-5 : The absence of mIi alters the conformation of I-A <sup>b</sup> .....	84
Figure 2-6 : Mature B-cells accumulate MHC II molecules with an AF6-120.1 <sup>+</sup> conformation.....	85
Figure 2-7 : Expression of Iip35 in immature BM B-cells.....	86
Figure 2-8 : T1 cells hIi <sup>high</sup> do not up-regulate MHC II levels.....	87

Figure 2-9 : Iip35 restores the mature B-cell compartment.....	88
Figure 2-10 : Supplementary figure S1. ....	89
Figure 2-11 : Supplementary figure S2. ....	89
Figure 2-12 : Supplementary figure S3. ....	90
Figure 3-1 : Iip35 is expressed in APCs.....	110
Figure 3-2 : Iip35 restores thymic selection. ....	111
Figure 3-3 : Normal levels of TCR on CD4 <sup>+</sup> T cells from Tg mice.....	112
Figure 3-4 : Iip35 restores the iNKT cells selection.....	113
Figure 3-5 : OVA presentation in the context of Iip35.....	113

## Liste des abréviations

AEP : *asparaginyl cysteine endoprotease*

AP : *adaptor protein*

APC : *antigen presenting cell*

Bcl-2 : *B cell lymphoma 2*

Bcl-XL : *B cell lymphoma-extra large*

BCR : *B cell receptor*

CD : cluster de différenciation

CD74 : chaîne invariante (ou II)

CDR : *complementary determining region*

CEG : cellules épithéliales gastriques

CFSE : *carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CIITA : *MHC class II transactivator*

CLIP : *class II-associated invariant chain peptide*

CLL : *chronic lymphocytic leukemia*

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMH I et CMH II : CMH de classe I et de classe II

CS : *chondroitin sulfate*

cTEC : *cortical thymic epithelial cell*

CXCL : *CXC chemokine ligand*

CXCR : *CXC chemokine receptor*

DC : *dendritic cell*

DRiPs : *defective ribosomal products*

ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

FO : *follicular B cell*

GC : *germinal center*

GI : *gastro-intestinal*

gp : *glycoprotéine*

HEL : *hen egg lysozyme*

HGF : *hepatocyte growth factor*

HLA : *human leucocyte antigen*

IFN : *interféron*

Ig : *immunoglobuline*

II : *chaîne invariante (ou CD74)*

IL : *interleukine*

iNKT : *invariant natural killers T cell*

IP : *immunoprécipitation*

JNK : *c-JunN-terminal kinase*

kDa : *kilo Dalton*

KLH : *keyhole limpet hemocyanin*

LIP : *leupeptin-induced peptide*

LPS : lipopolysaccharide

MAPK : *mitogen activated protein kinase*

MIF : *macrophage migration inhibitory factor*

mli : chaîne invariante murine

MIIC : *MHC II compartments*

(m)liKO : déficient en chaîne invariante (murine)

MK : *midkine cytokine*

MLB : *multilamellar bodies*

MMTV : *mouse mammary tumor virus*

MVB : *multivesicular bodies*

MZ : *marginal zone B cell*

NF : *newly formed B cell*

NF-κB : *nuclear factor κB*

OVA : ovalbumine

Pb (b) : paire de bases (bases)

pCMH : complexe peptide-CMH

PGE2 : prostaglandine E2

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PKC : protéine kinase C

PLC : *peptide loading complex*

PMA : *phorbol myristate acetate*

RE : réticulum endoplasmique

SAg : superantigène

SEA : *staphylococcal enterotoxin A*

SIV : *simian immunodeficiency virus*

SLE : *systemic lupus erythematosus*

SLIP : *small leupeptin-induced peptide*

Src : *proto-oncogene tyrosine-protein kinase*

Syk : *spleen tyrosine kinase*

T1 : *transitional 1 stage B cell*

T2 : *transitional 2 stage B cell*

TAF<sub>II</sub>105 : *TBP-associated factor<sub>II</sub>105*

TCR : *T cell receptor*

TEC : *thymic epithelial cell*

Tg : transgénique

TGF : *transforming growth factor*

TGN : *trans Golgi network*

Th : *T helper cell*

TM : région transmembranaire

TNF : *tumor necrosis factor*

TSST : *toxic shock syndrome toxin*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VLA-4 : *very late activation antigen 4*

## Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier chaleureusement mon directeur de recherche, Jacques Thibodeau, pour m'avoir accueillie dans son lab et m'avoir permis de réaliser ce projet. Je le remercie pour tout ce qu'il m'a apporté, au niveau scientifique et humain au cours de ces 6 ans qui ont été extrêmement enrichissants. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a témoignée et la liberté qu'il m'a laissée dans mon travail.

Je remercie également Nathalie Labrecque, notre collaboratrice, pour son aide et ses conseils précieux apportés pour le projet et la gestion des souris.

Merci aussi, aux membres de mon jury de thèse qui ont accepté de lire et de commenter ma thèse afin de me faire progresser.

Un grand merci aux membres du laboratoire, passés et présents, pour tous les bons moments au S-648. Un merci particulier à Marie-Hélène, Julie, Jean-Simon, Maryse et Mammad pour les discussions sur li, les résolutions de « foirage de manips » et pour le fun. Merci également à Magali pour son aide avec les macrophages et son soutien, à Julie pour la relecture des papiers et à Jean-Simon pour les belles figures d'li et du CMH.

Je voudrais également remercier tous les gens du département, qu'ils soient professeurs, étudiants, secrétaires ou techniciens, pour leur gentillesse et leur aide. Merci également à tous les étudiants des autres lab pour leur aide, les belles discussions et les éternels « - t'as terminé ? - moi non plus. - Dans 2 mois, certain ! ».

Je tiens à lancer un gros merci à tous mes amis, de France et d'ailleurs, pour leur soutien, leur aide et leur écoute dans les moments difficiles. Mais aussi pour tous les moments de plaisir, les 'partys', les heures au téléphone, les 5 à 7/restos fabuleux, les parties de tennis/squash/badminton et j'en passe ! Merci aux « européens » d'être passés me rendre visite et d'avoir fait flamber leur facture de téléphone. Merci aux « locaux » de m'avoir si bien entourée et m'avoir fait me sentir chez moi, au Québec. Un gros merci spécial à Marie-Hélène, Aurore et Florent, mes amis inestimables, pour tous nos voyages,

petits ou grands, pour les jasettes interminables, le soutien et tout le bon fun ! Vous êtes ma 2<sup>e</sup> famille ! Un gros merci également à Nico, Jean-Simon, Julie, Jeanne et Max, Flora, Raymonde et la « gang de chez France et associés » (Virginie, Véro, Roland, Seb, Jean-Mathieu, Chantal, Elise, Vincent, Christine, Richard...) pour tous les super moments passés ensemble et sans qui la vie serait pas mal plus plate. Merci aussi à mes « fans » français qui se reconnaîtront. Et merci à tous ceux que je n'ai pas cité mais qui n'en sont pas moins importants.

Enfin, un gros merci à ma famille qui m'a toujours soutenue et sans qui, je ne serais pas arrivée là où j'en suis. Je les remercie pour leurs encouragements et leur confiance dans les moments de doute, mais aussi tous les moments de plaisirs passés ensemble et pour me rappeler la question cruciale : « mais la chaîne invariante, c'est quoi *concrètement* ?».

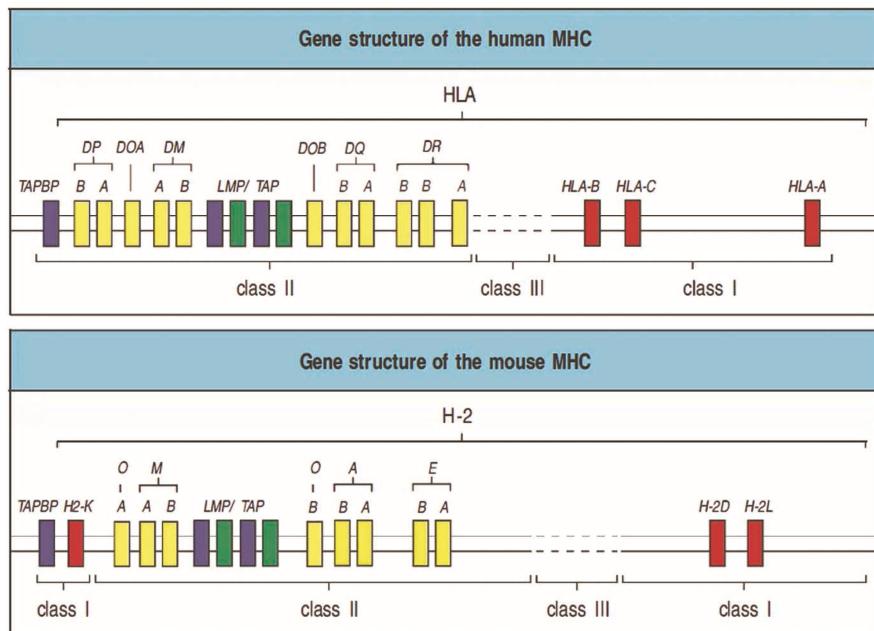
# Chapitre 1. Revue de Littérature

---

## 1.1. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) tire son nom de son implication dans les rejets de greffes. Il a été découvert par Peter Gorer et George D. Snell (chez la souris)<sup>1, 2</sup> et Jean Dausset (chez l'humain).<sup>3</sup> Snell et Dausset ont tous deux reçu le prix Nobel de physiologie/médecine en 1980 pour leurs travaux. Les molécules du CMH sont des glycoprotéines essentielles pour la discrimination entre le soi et le non-soi. Ces molécules sont très conservées au sein des mammifères.<sup>4, 5</sup> Il existe deux grandes familles parmi le CMH : le CMH de classe I (CMH I) et le CMH de classe II (CMH II) qui présentent des similitudes notamment au niveau de leur structure, leurs fonctions et leur organisation génomique.

Chez l'humain, le locus du CMH est localisé sur le bras court du chromosome 6 et code pour les molécules appelées HLA (*human leucocyte antigen*)<sup>6</sup> alors que chez la souris, il est situé sur le chromosome 17 et code pour les molécules H-2 (Figure 1-1).<sup>7, 8</sup>



**Figure 1-1 : Organisation des gènes du CMH chez l'humain et la souris.**

Les gènes du CMH I sont représentés en rouge et ceux du CMH II en jaunes. Les gènes identifiés en vert et violet sont des gènes codant des protéines associées à la présentation antigénique. Chez l'humain et la souris, le CMH I comporte trois gènes différents, HLA-A, -B et -C pour les humains et H2-K, -D et -L chez la souris. Ils codent la chaîne lourde des molécules du CMH I tandis que la  $\beta$ 2-microglobline est codée par un gène situé sur un autre chromosome. Les gènes A et B du CMH II codent les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules classiques et non classiques du CMH II. Les molécules classiques humaines sont HLA-DR, -DP et -DQ et celles de souris sont H2-A et -E. Les molécules non classiques sont HLA-DO et -DM chez les humains et H2-O et -DM (ou H2-M) chez la souris. Tiré de<sup>9</sup>.

### 1.1.1. Le CMH de classe I

La cristallisation du CMH I a permis d'élucider en détail la structure du complexe. Il se présente sous la forme d'un hétérodimère composé d'une chaîne lourde associée de manière non covalente à une chaîne légère, la  $\beta$ 2-microglobuline. Cette dernière est soluble, non polymorphique et est codée à l'extérieur du locus du CMH (sur le chromosome 15 chez l'homme et deux chez la souris).<sup>10, 11</sup> La chaîne lourde est une

glycoprotéine ancrée dans la membrane cellulaire et qui comporte trois domaines extracellulaires,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ , suivis d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique.<sup>12, 13</sup> Les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  forment la niche peptidique composée de deux hélices  $\alpha$  et d'un plancher formé de huit feuillets  $\beta$ .<sup>14, 15</sup> L'assemblage a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) où un peptide d'environ huit ou neuf acides aminés de long va se lier dans la niche peptidique du complexe.<sup>16, 17</sup>

Le CMH I est exprimé par toutes les cellules nucléées mais le niveau d'expression varie selon les différents tissus.<sup>18, 19</sup> L'expression est principalement modulée au niveau transcriptionnel. L'expression du CMH I est induite à la fois par l'IFN $\alpha/\beta$  et l'IFN $\gamma$ .<sup>20, 21</sup> L'induction peut être directe ou via l'induction du CIITA (*MHC class II transactivator*).<sup>22-24</sup>

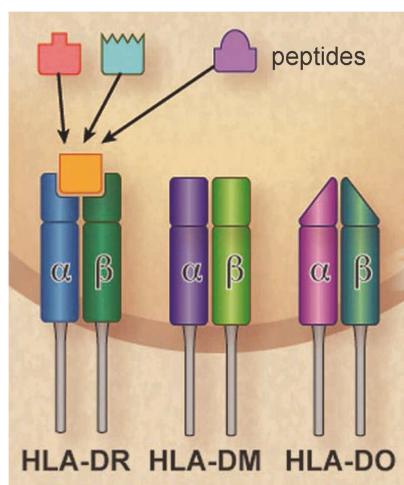
Dans la plupart des espèces, la chaîne lourde est codée par trois gènes (HLA-A, -B et -C chez l'humain et H2-K, -D et -L chez la souris) qui sont hautement polymorphiques et qui conduisent à une grande diversité de niches peptides reconnaissant des peptides uniques.<sup>25</sup> Certains allèles du CMH sont liés à des pathologies particulières ou confèrent un phénotype plus dramatique à la maladie. Par exemple, l'allèle HLA-B27 est fortement lié à la spondylarthrite ankylosante.<sup>26</sup> A contrario, cet allèle a un rôle protecteur face à l'infection par le virus de l'hépatite C.<sup>27</sup> Bien souvent, la nature de ce lien, entre certains allèles du CMH et des pathologies, demeure nébuleuse.

### 1.1.2. Le CMH de classe II

#### 1.1.2.1. Les gènes du CMH de classe II

Le locus du CMH contient plus de 200 gènes dont au moins 40 codent pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui composent les molécules HLA. Les autres gènes ont généralement une fonction liée à la présentation antigénique.<sup>4</sup> Parmi les molécules HLA, les molécules classiques comprennent trois isotypes chez l'humain : HLA-DR (DR), HLA-DP (DP) et HLA-DQ (DQ), et deux chez la souris H2-A (ou I-A) et H2-E (ou I-E) (Figure 1-2).<sup>4</sup> Brièvement, ces

molécules classiques du CMH II sont des hétérodimères composés d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  liées de manière non covalente pour former une niche permettant la liaison de peptides. Les molécules non classiques sont HLA-DM (DM) et HLA-DO (DO) chez l'homme, H2-DM et H2-O chez la souris.<sup>28, 29</sup> Contrairement aux molécules classiques, elles ont une niche plus resserrée qui ne peut pas lier de peptides. Leur rôle est de réguler la présentation antigénique en modulant la liaison de peptides sur les molécules classiques (Figure 1-2).



**Figure 1-2 : Structure des molécules du CMH II chez l'humain.**

Chez l'humain, les molécules classiques du CMH II sont HLA-DR, -DP et -DQ (représentés sur la figure par HLA-DR). Ce sont des hétérodimères composés des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dont l'association non covalente forme une niche qui permet la liaison de peptides. Les molécules non classiques HLA-DM et HLA-DO sont également des dimères formés d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  mais, contrairement aux molécules classiques, ne peuvent pas lier de peptides. Elles modulent la liaison de peptides sur les molécules classiques. Chez la souris les molécules classiques du CMH II sont H2-A et H2-E et les molécules non classiques sont H2-DM et H2-O. Modifié de<sup>30</sup>.

En plus d'être polygéniques, les molécules HLA sont extrêmement polymorphiques et la chaîne  $\beta$  est généralement plus variable que la chaîne  $\alpha$ .<sup>31, 32</sup> Ce polymorphisme est surtout concentré dans la niche peptidique afin de pouvoir lier la plus grande diversité de peptides possible dans le but de lutter contre un maximum de pathogènes.<sup>33</sup> Les

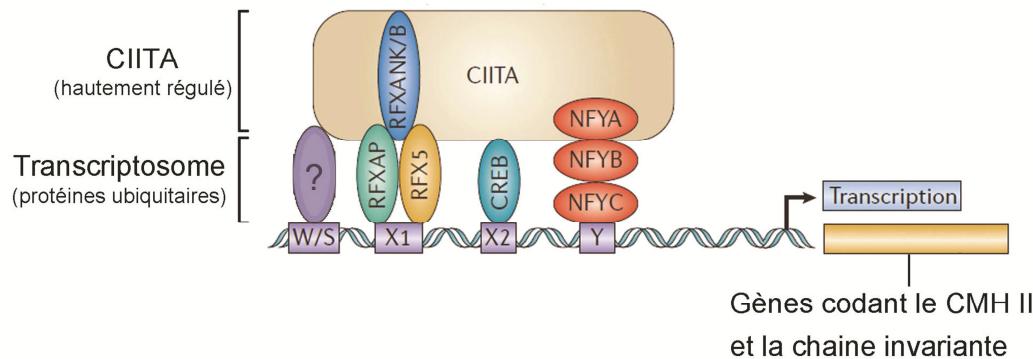
molécules non classiques, elles, sont pratiquement invariantes.<sup>33</sup> Les chaînes α et β sont codées par des gènes séparés qui peuvent avoir des duplications fonctionnelles (c'est le cas de DRβ) ou de type pseudo-gènes non fonctionnels.<sup>6</sup> Le gène H2-DMβ chez la souris possède deux gènes fonctionnels.<sup>34, 35</sup> La recombinaison génétique, au sein du CMH II, se fait principalement au niveau de « points chauds »<sup>36</sup> afin d'éviter des associations entre chaînes α et β qui ne s'apparieraient pas efficacement.<sup>36 37</sup> Le CMH II est crucial pour le système immunitaire et son expression doit être très finement régulée.

### 1.1.2.2. La régulation de l'expression du CMH de classe II

Les molécules du CMH II, contrairement à celles du CMH I, sont exprimées de manière constitutive seulement dans les cellules présentatrices d'antigènes (APC)<sup>38</sup> telles que les cellules B, les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les cellules épithéliales thymiques (TEC). Dans ces cellules ainsi que dans la majorité des autres types cellulaires, l'expression est induite par l'IFNγ.<sup>39</sup>

La régulation de l'expression se fait principalement au niveau transcriptionnel et se fait conjointement à celle des molécules non classiques DO<sup>40</sup> et DM<sup>41</sup> ainsi que la chaîne invariante.<sup>42</sup> Cette dernière a un rôle de chaperon pour les molécules HLA mais elle n'est pas codée par le CMH II et a une structure différente des molécules HLA. Cependant, son expression est régulée de manière similaire à celle des molécules du CMH II. Le contrôle de l'expression se fait grâce à un élément de régulation, très conservé, situé en amont du site d'initiation de la transcription. Ce module contient quatre éléments appelés W (ou S ou Z soit W/S/Z), X1, X2 et Y (Figure 1-3). Des protéines liant l'ADN interagissent spécifiquement avec ces domaines. Ainsi, l'élément Y lie le facteur NF-Y (ou CBF) composé des sous-unités A, B et C.<sup>43</sup> La région X1 s'associe avec le complexe RFX formé des protéines RFX-B/RFXANK, RFXAP et RFX-5.<sup>44</sup> La protéine CREB lie la boîte X2 et interagit avec RFX qui lie aussi NF-Y.<sup>45, 46</sup> Ce complexe de protéines constitue le transcriptosome qui

est inactif en absence du CIITA (aussi appelé C2TA chez la souris). Le CIITA ne lie pas l'ADN directement mais s'associe avec les protéines qui forment le transcriptosome ce qui induit l'initiation de la transcription (Figure 1-3).<sup>47, 48</sup>



**Figure 1-3 : Le contrôle de la transcription du CMH II.**

Les promoteurs des molécules classiques, non classiques et de la chaîne invariante sont très conservés et possèdent un module régulateur en amont du promoteur. Ce module contient quatre éléments : W/S, X1, X2 et Y sur lesquels viennent se fixer des protéines liant l'ADN qui sont exprimées de manière constitutive. Le complexe RFX lie l'élément X1, la protéine CREB lie X2 alors que l'hétérotrimère NF-Y lie la boîte Y. Ce gros complexe de protéines forme le transcriptosome auquel vient s'associer le transactivateur CIITA dont l'expression est très contrôlée. La liaison du CIITA sur le transcriptosome induit l'initiation de la transcription des gènes du CMH II. Adapté de<sup>49</sup> et<sup>50</sup>.

Cependant, les protéines du transcriptosome sont exprimées de manière constitutive et ne permettent donc pas le contrôle spécifique de l'expression du CMH II. Cette spécificité est due au CIITA.<sup>51</sup> Le spectre d'expression du CIITA est similaire à celui du CMH II. A l'instar du CMH II, la transcription du CIITA est induite par l'IFNγ, le LPS ou l'IL-4 et est réprimée par l'IFNβ, l'IL-10 ou le TGFβ.<sup>52, 53</sup> L'expression spécifique du CMH II dans certains types cellulaires ainsi que son induction par l'IFNγ, dépend donc de l'activation du CIITA.<sup>38, 54, 55</sup>

La régulation de ce transactivateur se fait surtout au niveau transcriptionnel. Le gène possède quatre promoteurs : pI, pII, pIII et pIV, produisant trois ARN différents ; le

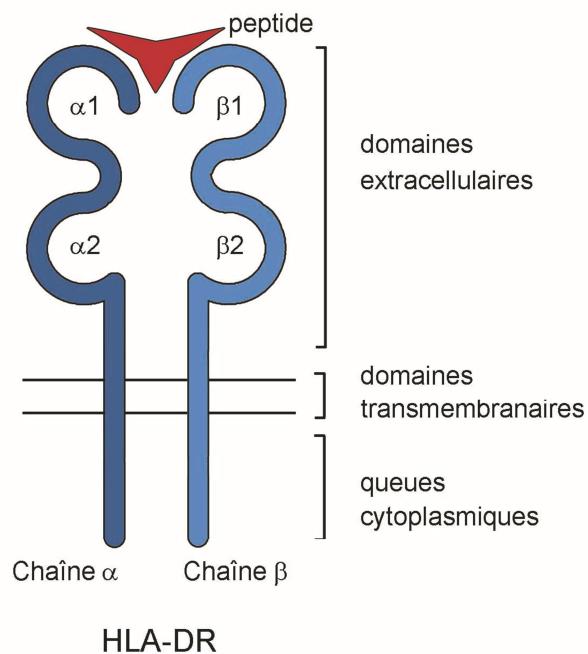
promoteur pII ayant une fonction inconnue.<sup>56</sup> Ils sont tous les trois inducibles à l'IFN $\gamma$ <sup>57</sup> mais ont une utilisation spécifique différente. Les études sur les souris déficientes en un, ou plusieurs promoteurs ont permis de décrypter la fonction de chacun.<sup>54, 55</sup> Le promoteur pI produit la majorité des ARN dans la majorité des populations et permet, à lui seul, une expression pratiquement normale du CMH II.<sup>58</sup> Il est un peu plus efficace que les autres pour induire la transcription de DR.<sup>59</sup> Le promoteur pIV a un rôle clé dans l'expression induite par l'IFN $\gamma$ . Bien que les promoteurs pI et pIII soient aussi inducibles, l'absence du pIV provoque une insensibilité à l'induction par l'IFN $\gamma$  dans les cellules non hématopoïétiques et une expression quasi nulle dans les TEC.<sup>38, 55</sup> Quant au promoteur pIII, il est crucial pour l'expression du CMH II dans toutes les populations de cellules B, *in vivo*.<sup>54</sup> Lors de la différenciation des cellules B en plasmocytes et lors de la maturation des DC, l'expression du CIITA est réprimée via le pIII.<sup>58</sup> Ce promoteur est aussi responsable de l'expression du CMH II dans les cellules T activées humaines alors que les cellules murines n'en expriment pas ou très peu.<sup>60, 61</sup> L'expression du CIITA peut également être contrôlée au niveau épigénétique. Par exemple, la méthylation du promoteur supprime l'expression du CIITA.<sup>62</sup> De plus, des modifications post-traductionnelles peuvent réguler son activité. La phosphorylation peut augmenter ou réduire sa fonction,<sup>63, 64</sup> alors que l'ubiquitination accroît sa capacité d'activation.<sup>65</sup>

Le CIITA est donc la pièce maîtresse du contrôle de l'expression du CMH II et sa régulation fine permet d'assurer la meilleure réponse possible contre les pathogènes. Inversement, il est une cible de choix utilisée par certains micro-organismes pour contourner le système immunitaire.<sup>66, 67</sup>

### 1.1.2.3. La structure des molécules du CMH II

Le CMH II est un hétérodimère transmembranaire de type I composé d'une chaîne  $\alpha$  de 32 kDa et d'une chaîne  $\beta$  de 29 kDa qui sont liées de manière non covalente. Chaque

chaîne possède quatre domaines codés par des exons différents.<sup>68</sup> Il y a deux domaines extracellulaires ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  pour la chaîne  $\alpha$  ;  $\beta_1$  et  $\beta_2$  pour la chaîne  $\beta$ ), une région transmembranaire et une queue cytoplasmique.<sup>69</sup> Les domaines  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  forment la niche peptidique (Figure 1-4).



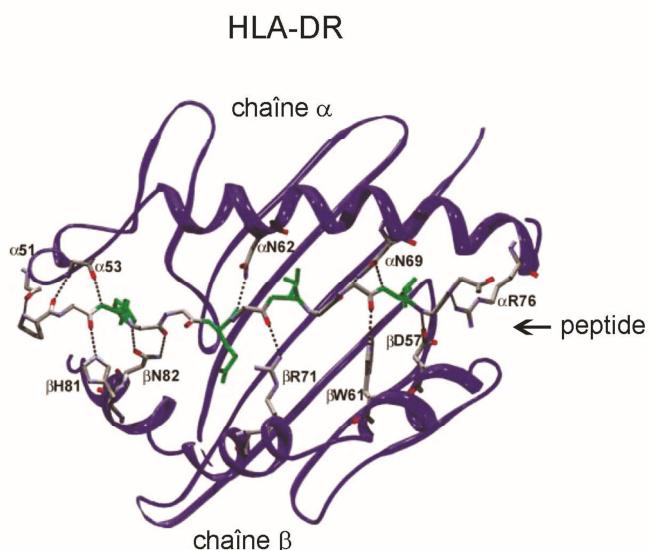
**Figure 1-4 : Structure du CMH de classe II.**

Le CMH II est formé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  liées non covallement. Les domaines extracellulaires  $\alpha_1$  et  $\beta_1$  forment la niche peptidique. Les deux chaînes sont ancrées dans la membrane.

La niche peptidique est composée de deux hélices  $\alpha$  entourant un plancher de huit feuillets  $\beta$  anti-parallèles formant une « fente » dans laquelle vient se loger le peptide. La niche, ouverte aux jonctions  $\alpha$  et  $\beta$ , permet d'accommoder des peptides de 13 à 18 acides aminés de long.<sup>70</sup>

La structure tridimensionnelle des complexes peptide-CMH II (pCMH II) a été élucidée grâce, entre autres, à des constructions fusionnant le peptide et le CMH II en une

seule chaîne. Ainsi, les molécules humaines HLA-DR1,<sup>71, 72</sup> HLA-DR3 et –DR4,<sup>73, 74</sup> ainsi que les chaînes murines I-A<sup>k</sup>, I-A<sup>d</sup>, I-A<sup>g7</sup> et I-E<sup>k</sup><sup>75, 76</sup> ont été cristallisées et ont permis de révéler la structure de la niche et de son peptide lié. Pour comprendre le mécanisme de liaison, il faut savoir que les peptides sont formés d'une chaîne principale, le squelette ; et de chaînes latérales qui sont des résidus placés de part et d'autres du squelette. La niche peptidique, quant à elle, présente, sur toute la longueur de la fente, des cavités appelées les « poches » (Figure 1-5).



**Figure 1-5 : La structure tridimensionnelle de la niche peptide.**

La niche peptidique est composée de deux hélices  $\alpha$  entourant un plancher de huit feuillets  $\beta$  anti-parallèles et elle permet d'accueillir des peptides de 13 à 18 résidus. En vert sont identifiés les résidus du peptide en contact avec le CMH II au niveau des principaux points d'ancrages. Les résidus du CMH II qui forment des ponts hydrogènes sont numérotés. Les numéros sont précédés des lettres  $\alpha$  ou  $\beta$  indiquant qu'ils sont situés sur la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$  respectivement. Modifié de<sup>77</sup>.

Des ponts hydrogènes sont formés entre le squelette du peptide et des résidus du CMH II qui sont très conservés, permettant ainsi la stabilisation du complexe.<sup>78</sup> Cette connexion est indépendante des chaînes latérales du peptide et permet la liaison de n'importe quel peptide ayant une structure du squelette adéquate. Ensuite, les chaînes latérales du peptide sont accommodées dans les poches tout au long de la niche

peptidique du CMH II.<sup>79</sup> La majorité des peptides retrouvés dans la niche ont des résidus conservés à des positions particulières car certaines poches sont très restrictives quant à la séquence qu'elles lient et sont caractéristiques des différents isotypes. Ce sont les points d'ancre primaires des chaînes latérales. Les autres poches n'ont pas de préférence aussi stricte pour la liaison mais modulent l'affinité des complexes pCMH II. Ce sont les points d'ancre secondaires.<sup>80, 81</sup> La liaison du peptide au CMH II aboutit à une structure compacte qui place le peptide au centre de la surface de liaison du TCR (récepteur des cellules T). Ainsi, le TCR est orienté en diagonale sur la surface du pCMH II. Les six régions CDR (*complementary determining region*) du TCR font des contacts avec le peptide et le CMH II.<sup>82, 83</sup> La liaison du TCR sur le pCMH II est très conservée même s'il y a des ajustements et de la flexibilité pour permettre une liaison TCR/pCMH II optimale et initier la signalisation.<sup>84, 85</sup>

## 1.2. La présentation antigénique

### 1.2.1. La présentation par le CMH de classe I

Les molécules du CMH I présentent principalement des antigènes cytosoliques aux cellules T CD8+.

Les peptides présentés par le CMH I proviennent de la dégradation de protéines par le protéasome. Ils peuvent être issus de protéines en fin de vie mais aussi de protéines non fonctionnelles (DRiPs, *defective ribosomal products*) résultant d'une mauvaise transcription ou traduction d'un cadre de lecture alternatif ou encore d'un échec de l'assemblage de grosses protéines.<sup>86, 87</sup> Ces protéines sont dégradées immédiatement après traduction afin d'éviter la formation d'agrégats.<sup>88</sup> La protéolyse peut se faire de deux manières : par la dégradation par le protéasome ou par autophagie. Le protéasome 26S génère des peptides d'une longueur de 4 à 15 résidus qui doivent ensuite subir un

clavage final à l'extrémité amino-terminale.<sup>89-91</sup> Dans les APC induites par l'IFN $\gamma$ , le protéasome « constitutif » est transformé en « immunoprotéasome », plus actif pour prévenir la formation d'agrégats néfastes pour la viabilité cellulaire.<sup>92-94</sup> L'autophagie est un autre mécanisme permettant de cataboliser des protéines. Des parties de cytosols, contenant les protéines à éliminer, sont emprisonnées dans des grosses vacuoles : les autophagosomes. Ils fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former des phagolysosomes capables de digérer le contenu cytoplasmique séquestré.<sup>95, 96</sup> L'induction de l'autophagie peut accroître la présentation antigénique par le CMH I et ainsi augmenter l'activation des cellules T CD8+, comme c'est le cas dans les macrophages infectés par le virus de l'Herpès simplex.<sup>97</sup>

Les peptides générés dans le cytoplasme doivent ensuite être relocalisés dans le RE où aura lieu l'assemblage avec les molécules du CMH I. Cette tâche incombe au transporteur TAP qui pompe des peptides de 8 à 16 résidus, du cytosol vers le RE.<sup>98, 99</sup> Les peptides subissent alors un ultime clavage effectué par des aminopeptidases (ERAP1 et 2 chez l'homme et ERAAP chez la souris).<sup>100-102</sup> En absence de peptides, les chaînes lourdes du CMH I sont stabilisées par la calnexine qui favorise le repliement des glycoprotéines.<sup>103</sup> Lors de la liaison à la chaîne légère  $\beta$ 2-microglobuline, la calnexine est remplacée par la calreticuline et les protéines ERp57 et PDI.<sup>104-106</sup> Ce complexe se lie ensuite à la pompe TAP via la tapasine.<sup>107</sup> Ce multi-complexe est appelé le complexe de chargement de peptide (PLC, *peptide loading complex*).<sup>108</sup> Le PLC s'assure de la bonne liaison du peptide sur le CMH I. Cette liaison va induire une conformation stable du complexe et permettre le relâchement des protéines chaperons. Les complexes migrent ensuite hors du RE vers la surface afin de présenter le peptide aux cellules T CD8+.<sup>109</sup> Les peptides présentés par le CMH I peuvent également provenir de cellules avoisinantes, par exemple des cellules infectées. Le transfert de peptides du cytosol d'une cellule à l'autre se fait via des jonctions lâches.<sup>110</sup> Ainsi, une cellule apoptotique, dont les caspases ont généré des

peptides, peut transférer ces derniers à une cellule voisine qui pourra effectuer la présentation.<sup>111</sup>

### 1.2.2. La présentation par le CMH de classe II

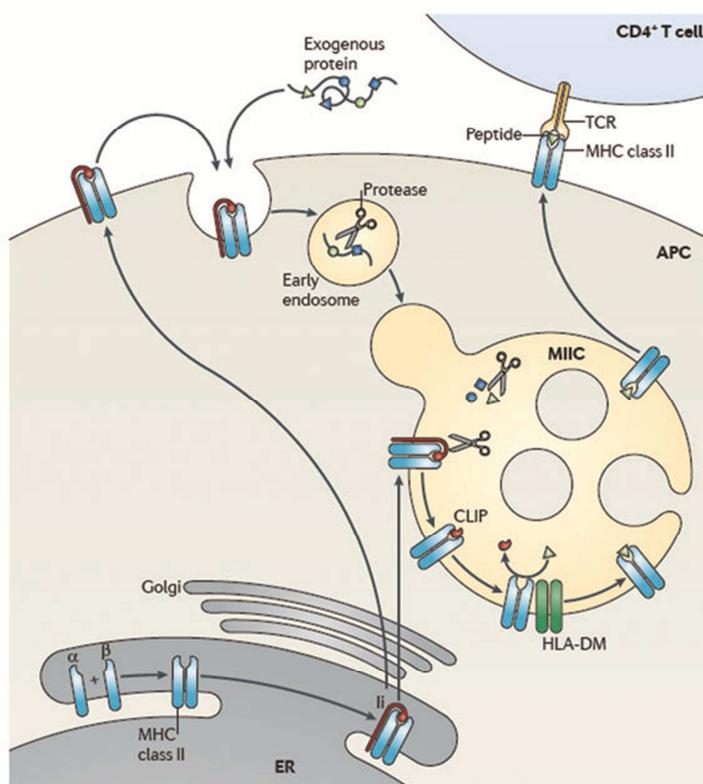
Le CMH II est chargé de présenter les antigènes exogènes aux récepteurs des cellules T CD4+.

Le CMH II et la chaîne invariante (li ; CD74) s'associent dans le RE. Les deux chaînes α et β du CMH II s'assemblent en un dimère qui lie un trimère préformé de chaîne invariante.<sup>112</sup> Les complexes sortent du RE, maturesnt dans le Golgi puis sont ciblés dans la voie endosomale grâce au motif di-leucine contenu dans la queue cytoplasmique de la chaîne invariante.<sup>113-115</sup>

Les endosomes tardifs ou lysosomes sont des organelles caractérisées par un pH plus acide et dans lesquels sont dégradés les antigènes.<sup>116</sup> Dans les APC, ils sont riches en CMH II, li, HLA-DM, HLA-DO et cathepsines et sont appelés les MIIC (*MHC II compartments*). C'est ici qu'a lieu le chargement de peptides sur le CMH II.<sup>117, 118</sup> Initialement identifiés comme des corps multi-lamellaires (MLB, *multilamellar bodies*), ils peuvent aussi avoir une morphologie multi-vésiculaire (MVB, *multivesicular bodies*) suivant leur stade de maturation.<sup>119, 120</sup> Pour plus de clarté, les endosomes tardifs/lysosomes seront nommés endosomes ou MIIC pour la suite du texte.

Dans ces MIIC, li est dégradé séquentiellement jusqu'au CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*), logé dans la niche, dont l'échange pour un peptide de forte affinité est catalysé par DM.<sup>121-123</sup> DM est une molécule non classique du CMH II qui a une structure semblable mais qui ne peut pas lier de peptide car sa niche est « fermée » par les contacts entre les domaines α1 et β1.<sup>124, 125</sup> Elle est nécessaire pour la dissociation du CLIP avec le CMH II, en particulier pour les allèles qui ont une forte affinité pour le CLIP comme HLA-DR1 ou I-A<sup>b</sup>.<sup>126, 127</sup> DM induit aussi la dissociation de n'importe quel peptide

afin de favoriser la liaison de peptide ayant une forte affinité pour le CMH II<sup>128-130</sup> et il a donc un rôle d'édition qui façonne le répertoire de peptide.<sup>131, 132</sup> De plus, DM a un rôle de chaperon qui stabilise le CMH II vide.<sup>133-135</sup> En effet, le CMH II non lié à un peptide est très instable et l'association avec DM prévient son agrégation et le maintient dans une conformation réceptive au peptide.<sup>136-138</sup> Les complexes migrent ensuite à la surface cellulaire pour procéder à la présentation aux cellules T CD4 (Figure 1-6).



**Figure 1-6 : La présentation antigénique par le CMH de classe II.**

Le CMH II et la chaîne invariante s'assemblent dans le réticulum endoplasmique (ER). La chaîne invariante cible les complexes vers les MIIC, soit directement soit via la surface cellulaire. Les protéines exogènes sont aussi internalisées dans les endosomes pour être dégradées en peptide. Dans les MIIC, la chaîne invariante est clivée puis HLA-DM catalyse l'échange du CLIP pour un peptide exogène de forte affinité. Les complexes peptide-CMH II migrent vers la surface où a lieu la présentation aux cellules T CD4+. Tiré de<sup>139</sup>.

### 1.2.3. La présentation croisée

La présentation croisée est un phénomène surtout observé dans les DC mais qui peut avoir lieu dans d'autres types cellulaires comme les macrophages ou les cellules B.<sup>140-142</sup> C'est le processus par lequel les molécules du CMH I présentent des antigènes d'origine exogène.<sup>143, 144</sup> La présentation croisée est nécessaire pour l'induction de nombreuses réponses immunitaires médiées par les cellules T, incluant celles contre les virus, les bactéries et les tumeurs.<sup>145</sup> De plus, elle permet une réponse anti-virale lorsque seules les cellules non-hématopoïétiques sont infectées.<sup>146</sup> La présentation croisée implique une communication entre la voie endosomale d'un côté, et le cytosol et le RE de l'autre. Le mécanisme précis de cette transmission demeure incertain, mais deux principales voies ont été proposées.

Dans la première voie, dite « cytosolique », les antigènes internalisés pourraient accéder au cytosol directement après internalisation ou être transportés dans le cytosol par un mécanisme de rétro-translocation du RE.<sup>147-149</sup> Les antigènes alors contenus dans le cytosol, sont transportés dans le RE par la pompe TAP et sont ensuite chargés sur le CMH I de la même manière que dans la voie classique.<sup>150</sup>

Dans le cas de la voie dite « vacuolaire », la présentation croisée se fait indépendamment de la pompe TAP ou du protéasome.<sup>151</sup> Dans les endosomes, les antigènes internalisés sont dégradés en peptides qui lient la niche peptidique du CMH I.<sup>152-154</sup> La provenance des molécules du CMH I retrouvées dans les endosomes est encore sujette à débat et deux voies ont été proposées. Premièrement, le CMH I pourrait être transporté directement du RE dans les endosomes.<sup>155</sup> Deuxièmement, il pourrait être exprimé en surface puis être internalisé dans les endosomes grâce au motif tyrosine contenu dans sa queue cytoplasmique.<sup>155, 156 145</sup> L'équipe de Jefferies a également démontré que la chaîne invariante, qui possède un motif de ciblage aux endosomes et se

lie au CMH I,<sup>157, 158</sup> a un rôle essentiel dans le ciblage du CMH I dans la voie endosomale et par conséquent est essentielle pour la présentation croisée par la voie vacuolaire.<sup>159, 160</sup>

#### 1.2.4. La présentation des lipides par les molécules CD1

Les molécules CD1 sont chargées de présenter des antigènes lipidiques aux cellules T. Chez l'humain, il y a cinq isoformes : CD1a, CD1b, CD1c, CD1d et CD1e. Chez la souris, seule l'isoforme CD1d est présente.<sup>161</sup> Les molécules CD1a, CD1b et CD1c font partie du groupe I et interagissent avec les cellules T conventionnelles exprimant un TCR $\alpha\beta$ .<sup>162</sup> Le groupe II comporte seulement l'isoforme CD1d qui interagit avec des cellules T, dites iNKT, qui expriment le TCR invariant V $\alpha$ 24 (chez les humains) ou V $\alpha$ 14 (chez les souris).<sup>163</sup> L'isoforme CD1e est différente des autres isoformes et n'appartient à aucun des deux groupes. Elle n'est pas exprimée en surface et ne présente pas de lipides mais joue un rôle d'édition du répertoire de peptides lipidiques.<sup>164</sup>

Les différentes isoformes CD1 ont un trafic intracellulaire qui leur est propre. Cependant, excepté CD1e, elles sont toutes exprimées en surface et recyclées dans la voie endosomale grâce au motif tyrosine contenu dans leur queue cytoplasmique.<sup>165</sup> Les isoformes CD1b, CD1c et CD1d sont directement exprimées en surface puis internalisées dans les endosomes via l'adaptateur AP2 et la clathrine.<sup>165-168</sup> La molécule CD1d murine utilise les adaptateurs AP2 et AP3.<sup>166, 169-171</sup> Dans les lysosomes, les molécules CD1 chargent des lipides antigéniques et les complexes migrent ensuite à la surface pour la présentation antigénique aux cellules T.<sup>172</sup> Cependant, certains lipides sont chargés directement à la surface cellulaire, comme l'agoniste des iNKT, le  $\alpha$ GalactosideCeramide ( $\alpha$ GalCer) qui lie CD1d.<sup>173</sup> Le trafic intracellulaire de CD1a et CD1d (humain et murin) est également contrôlé par la chaîne invariante (li, associée ou non avec le CMH II).<sup>168, 174</sup> En effet, CD1a et CD1d s'associent avec li dans le RE, ce qui leur permet d'être ciblés dans les endosomes et d'être recyclés via la surface.<sup>167, 175</sup> Cette voie est dépendante des

cathepsines S et L qui clivent la chaîne invariante.<sup>174, 176</sup> Néanmoins, CD1d est capable de migrer dans les endosomes même en absence de li et présente alors un lipide, quel que soit son trafic (via les endosomes ou directement à la surface).<sup>177</sup> En présence d'li, CD1d est ciblé dans les endosomes où il lie l'antigène, avant de rejoindre la surface.<sup>167</sup> Enfin, la présentation des complexes antigène/CD1d est essentielle pour le maintien de l'homéostasie des cellules iNKT.<sup>178</sup> Les souris déficientes en chaîne invariante ont un nombre de cellules iNKT très réduit.<sup>179</sup>

### 1.3. La chaîne invariante

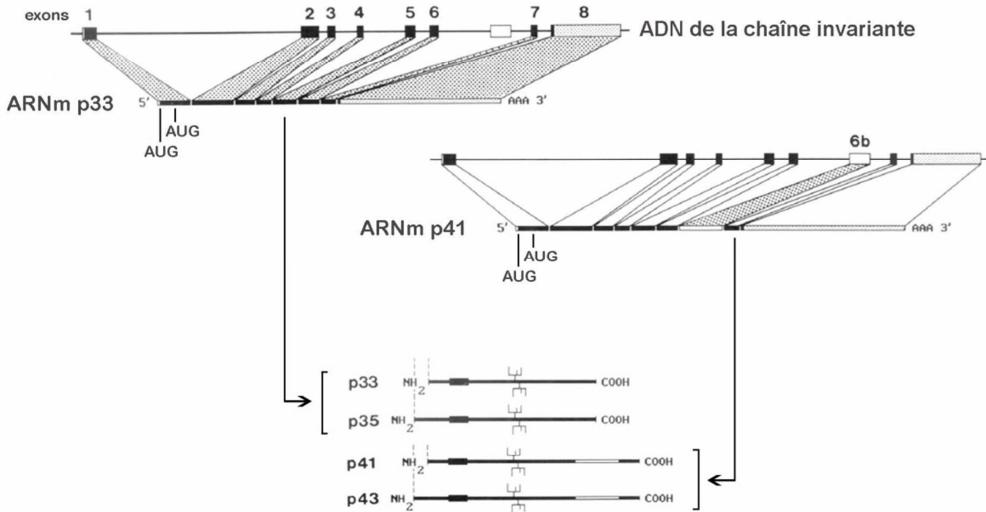
#### 1.3.1. Les gènes de la chaîne invariante et la régulation de l'expression

La chaîne invariante de souris a été découverte en 1978 par l'équipe de MacDevitt qui a immunoprécipité cette protéine en utilisant des anticorps anti-CMH II. Ils ont identifié la forme humaine peu après.<sup>180, 181</sup> Dans les deux cas, il s'agit d'une protéine non polymorphique qui est codée en dehors du locus du CMH II et qui possède son propre promoteur. Chez la souris, le gène est situé sur le chromosome 18 et chez l'homme, sur le chromosome 5.<sup>182, 183 184</sup> Comme le CMH II, la chaîne invariante est exprimée constitutivement dans les cellules B, les DC, les macrophages et les monocytes, ainsi que dans les cellules épithéliales thymiques (TEC). Elle est également exprimée par des cellules non-APC telles que les cellules épithéliales gastriques.<sup>185</sup> Son expression est induite par des cytokines telles que l'IFNy et le TNF $\alpha$ , entre autres.<sup>186, 187</sup> Les gènes du CMH II et d'li sont régulés conjointement et de manière assez similaire. En amont du promoteur de la chaîne invariante se trouve le module de régulation comprenant les éléments W/S/Z, X1, X2 et Y qu'on retrouve également au niveau des gènes du CMH II (voir section 1.1.2.2). Par contre, la chaîne invariante peut être exprimée en absence du CMH II dans les

lymphocytes B immatures, les plasmocytes ou encore les cellules épithéliales.<sup>188, 189</sup> Cette expression spécifique de la chaîne invariante et différente de celle du CMH II est due à un contrôle de la transcription d'Ii qui lui est propre. En effet, le promoteur de la chaîne invariante contient deux sites de liaison à NF-κB et un à Sp1.<sup>190, 191</sup> La liaison de ces sites par les facteurs de transcription permet l'induction de la transcription du gène d'Ii.<sup>192</sup> De plus, dans le premier intron du gène d'Ii se trouve un autre élément de régulation qui permet l'activation spécifique de la transcription.<sup>193</sup> Ces différents éléments de régulation permettent le contrôle de l'expression spécifique d'Ii de manière indépendante du CMH II.

### 1.3.2. Structure de la chaîne invariante

Il existe quatre isoformes de la chaîne invariante chez l'homme : lip33, lip35, lip41 et lip43; et deux seulement chez la souris : lip31 et lip41.<sup>194</sup> Le gène contient neuf exons et un épissage alternatif de l'exon 6b conduit à la synthèse de deux ARN messagers différents. Ils codent les protéines lip31 et lip41 chez la souris (lip33 et lip41 chez l'humain) de 31(33) kDa et 41kDa respectivement (Figure 1-7). L'exon 6b code pour un domaine extracellulaire contenu dans lip41 et lip43.<sup>195-197</sup> Les isoformes lip31 ou lip33 sont cinq fois plus exprimées que les formes lip41 et lip43.<sup>198, 199</sup> Chez l'homme, et sur les deux ARNm, un codon AUG situé 48b en amont du site de traduction habituel conduit à la production des isoformes lip35 et lip43 qui contiennent une extension de 16 acides aminés de la queue cytoplasmique. La forme humaine lip33 est cinq fois plus abondante qu'lip35.<sup>112, 196-198, 200, 201</sup> Ainsi la forme lip41 a un domaine extracellulaire supplémentaire, la forme lip35 a une queue cytoplasmique plus longue et la forme lip43 a les deux (Figure 1-7).

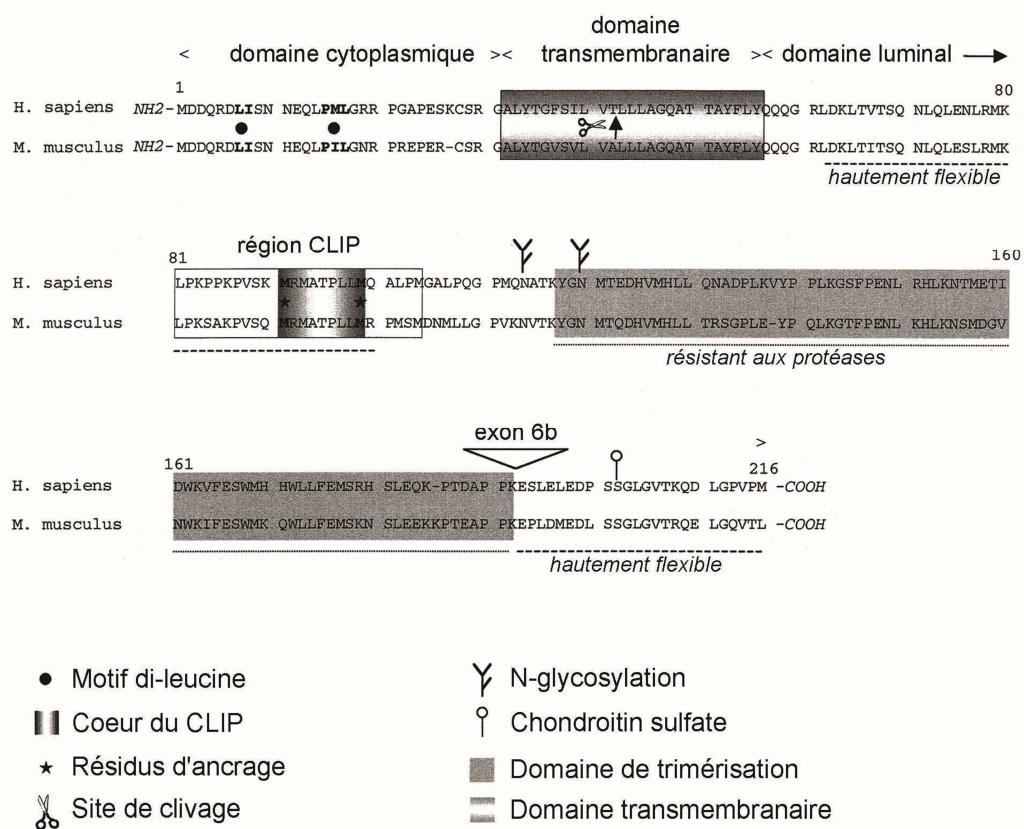


**Figure 1-7 : Épissage et traduction alternatifs de l'ARNm de la chaîne invariante conduisant aux quatre isoformes.**

L'ARNm de la chaîne invariante subit un épissage alternatif de l'exon 6b qui conduit à la production de deux ARNm différents. Deux sites d'initiation de la traduction sur chaque ARNm conduisent à la synthèse des formes lip33 et lip35 d'une part et des formes lip41 et lip43 d'autre part. Les formes lip35 et lip43 ont une extension de leur queue cytoplasmique alors que les formes lip41 et lip43 ont un domaine extracellulaire supplémentaire. Modifié de <sup>198</sup>.

La chaîne invariante est une glycoprotéine membranaire de type II, non polymorphe composée de différents domaines (Figure 1-8). Tout d'abord, en N-terminal se trouve la région cytoplasmique de 28 acides aminés (pour les formes lip31, lip33 et lip41), suivie d'un domaine transmembranaire de 26 acides aminés hydrophobes et enfin, une région extracellulaire, en C-terminal, de 160 acides aminés pour les formes lip31, lip33 et lip35 et de 224 acides aminés pour les formes lip41 et lip43. Ce domaine comprend la région CLIP formée des résidus 81 à 104 d'ici et qui se loge dans la niche peptidique du CMH II.<sup>202</sup> Les 64 acides aminés codés par l'exon 6b, retrouvés chez lip41 et lip43, constituent un domaine riche en cystéines qui a une homologie de séquence avec les éléments répétés thyroglobulines.<sup>203</sup> Cette séquence est très conservée et possède

88% d'homologie entre les souris et les humains. Les formes lip31 et lip33 partagent 70 à 80% d'homologie.<sup>203</sup>

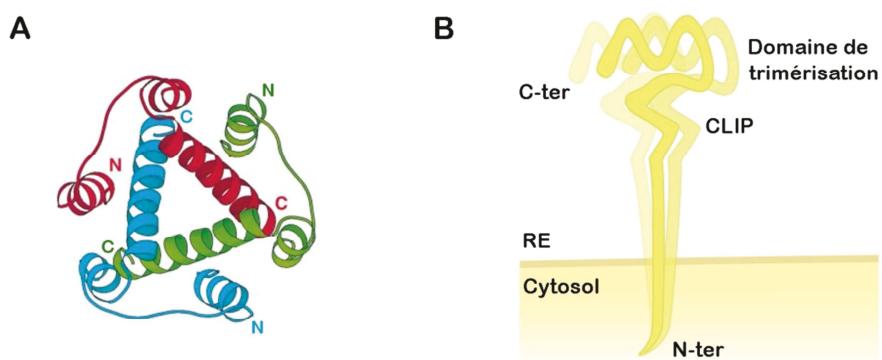


**Figure 1-8 : Structure de la chaîne invariante.**

Les chaînes invariantes humaines et murines sont des protéines de types II composées de plusieurs domaines. Tout d'abord, en N-terminal, se trouve le domaine cytoplasmique qui contient le motif di-leucine de ciblage dans les endosomes (points noirs). Ensuite il y a le domaine transmembranaire suivi du domaine luminal qui inclut la région CLIP, dont les résidus d'ancrages sont identifiés par une étoile, et le domaine de trimérisation résistant aux protéases. Il y a deux sites de glycosylation et un site de liaison du chondroitine sulfate (identifiés dans la légende). L'exon 6b code pour une région (triangle) qui se situe juste après le domaine de trimérisation (zone grise). Modifié de<sup>204</sup>.

### 1.3.3. Synthèse et assemblage de la chaîne invariante avec le CMH II

La chaîne invariante et le CMH II s'associent dans le RE. La chaîne invariante forme d'abord un trimère, environ cinq minutes après synthèse. Ce trimère lie ensuite deux à trois dimères  $\alpha\beta$  du CMH II pour former les complexes li-CMH II.<sup>112, 205, 206</sup> Des études ont permis d'observer que la trimérisation d'li nécessitait une région située dans la partie extracellulaire commune à toutes les isoformes d'li. Ce 'domaine de trimérisation', composé des résidus 118 à 192, est résistant aux protéases et est très structuré.<sup>207-211</sup> Il est organisé en hélices  $\alpha$  sur-enroulées qui forment un échafaudage permettant la liaison des hétérotrimères  $\alpha\beta$  du CMH II (Figure 1-9).<sup>212</sup>

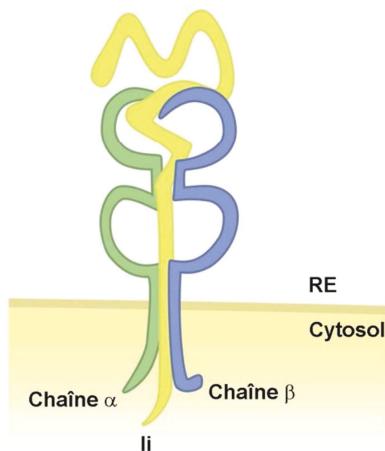


**Figure 1-9 : Modèle d'un trimère de chaîne invariante.**

A, Structure des domaines de trimérisation (118-192) d'li associés en trimère. La schématisation est une vue de dessus du trimère. Chaque monomère de la chaîne invariante est coloré en vert, bleu ou rouge. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées. Les extrémités pointent à l'opposé du lecteur. Modifié de<sup>212</sup>. B, Schématisation d'un homotrimère de chaîne invariante. Les portions N-terminales sont dans le cytosol tandis que les extrémités C-terminales sont dans le RE. La région CLIP et le domaine de trimérisation sont indiqués. Image dessinée par Jean-Simon Fortin.

Le domaine transmembranaire (TM) pourrait avoir un rôle dans la trimérisation, mais cela demeure controversé. Des chaînes invariantes mutées au niveau du TM, et en particulier sur les résidus 47, 49 et 50, sont beaucoup moins efficaces pour former des

trimères que les molécules sauvages.<sup>213-216</sup> Cependant, une étude très récente de Majera et ses collaborateurs a montré que la chaîne invariante pouvait trimériser même lorsque le domaine TM était tronqué. Ils suggèrent que les mutations ponctuelles utilisées dans les autres études pourraient détruire les interactions entre les hélices transmembranaires et ainsi modifier l'orientation de la partie lumineuse d'Ii ce qui aurait pour conséquence d'empêcher la trimérisation.<sup>217</sup> Il est possible que le domaine TM ne soit pas absolument requis pour la trimérisation mais stabilise le complexe et facilite la formation du trimère. La chaîne invariante est synthétisée en excès donc toutes les molécules du CMH II sont liées à Ii dans les conditions physiologiques.<sup>113, 218, 219</sup> Les paires  $\alpha\beta$  du CMH II se lient successivement à l'échafaudage du trimère d'Ii.<sup>205, 217, 220, 221</sup> La déstabilisation du trimère d'Ii empêche la formation du complexe avec le CMH II (Figure 1-10).<sup>214</sup>



**Figure 1-10 : Schématisation du complexe Ii-CMH II.**

La chaîne invariante (jaune) forme un trimère qui se lie ensuite aux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH II (vertes et bleues respectivement). Pour plus de clarté, cette figure montre le CMH II lié à une seule chaîne invariante. La région CLIP se loge dans la niche peptidique du CMH II. Image dessinée par Jean-Simon Fortin.

De nombreuses études ont permis d'élucider la structure tridimensionnelle des complexes pCMH II ou CLIP-CMH II. Le CLIP est la section de la chaîne invariante formée

par les résidus 81 à 104.<sup>222, 223</sup> Le cœur du CLIP est composé des neuf résidus 91 à 99 dont la séquence MRMATPLLM est la même pour la souris et l'humain. Par contre, la séquence du CLIP qui flanke le cœur est différente entre les deux espèces.<sup>224, 225</sup> Des expériences montrant la compétition entre le CLIP et un peptide pour la liaison au CMH II ont permis de découvrir que le CLIP se lie à la niche peptidique du CMH II.<sup>209</sup> Les études de cristallographies ont confirmé cette découverte et ont montré que cette liaison est semblable à celle d'un peptide antigénique.<sup>71, 74</sup> En effet, comme pour les peptides, le centre du CLIP est logé dans la niche peptidique et les résidus aux extrémités sortent de la fente.<sup>74, 226-231</sup> Il est capable de lier tous les allèles du CMH II mais l'affinité pour ces derniers est variable.<sup>228, 232</sup> Les résidus méthionines (en particulier le résidu Met91) sont importants pour la liaison aux différents allèles (Figure 1-8).<sup>226, 227, 229</sup> La liaison d'Il au CMH II ne repose pas uniquement sur le CLIP. En effet, les régions immédiatement en N- et C-terminal du cœur du CLIP (résidus 81 à 89 et 103 à 118 respectivement), ainsi qu'une région située dans le C-terminal du domaine de trimérisation participent à la liaison entre les deux molécules.<sup>233-237, 209</sup> Les domaines transmembranaires d'Il et du CMH II contribuent aussi à la formation des complexes.<sup>213, 238, 239</sup>

Ainsi le modèle d'assemblage suggère que les chaînes invariantes lient le CMH II par leur région CLIP qui se loge dans la niche et que des contacts additionnels au niveau du C-terminal d'Il et du TM stabilisent le complexe.

### 1.3.4. Rôles de la chaîne invariante dans le RE

#### 1.3.4.1. Rôle de chaperon

La chaîne invariante a de nombreux rôles et ses premières actions commencent dans le RE. En effet, le CMH II peut s'assembler en absence d'Il mais forme des agrégats.<sup>240-242</sup> Ces agrégats sont reconnus comme protéines mal repliées par les

protéines du RE.<sup>240</sup> En effet, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  nouvellement synthétisées ont été trouvées associées à plusieurs protéines du RE telles que BiP(grp78),<sup>241, 243, 244</sup> ERp72a ou encore grp94.<sup>245</sup> Cependant, le flou demeure quant à savoir si ces protéines ont un rôle physiologique ou si cette interaction est due à l'absence d'Ii dans les systèmes étudiés. La calnexine, une autre protéine résidante du RE, s'associe aux complexes Ii-CMH II en cours d'assemblage et pourrait assister la formation de ces complexes en stabilisant l'échafaudage pendant la liaison du CMH II à Ii.<sup>246, 247</sup> Les agrégats transitoires de CMH II échappent à cet état grâce à la chaîne invariante qui va les aider à se replier correctement.<sup>241, 248</sup> Elle agit donc comme un chaperon spécifique du CMH II.<sup>249, 250</sup>

#### 1.3.4.2. Prévention de la liaison indésirable de polypeptides

Le deuxième rôle de la chaîne invariante dans le RE est le blocage de la niche peptidique pour empêcher la liaison indésirable de polypeptides du RE. Pendant longtemps, on a cru qu'Ii empêchait la liaison de peptides normalement destinés au CMH I, mais des études sur des cellules déficientes en chaîne invariante ont montré que ces peptides ne lient pas de manière stable le CMH II.<sup>240, 251-254</sup> On sait maintenant que la chaîne invariante sert à bloquer la liaison indésirable de plus longues séquences de protéines mal repliées qui sont en cours de synthèse dans le RE.<sup>202, 220, 255-257</sup> En effet, comme la liaison d'un peptide et de la chaîne invariante sur le CMH II est mutuellement exclusive, l'occupation de la niche par le CLIP empêche la liaison de peptides.

#### 1.3.4.3. Sortie du réticulum endoplasmique

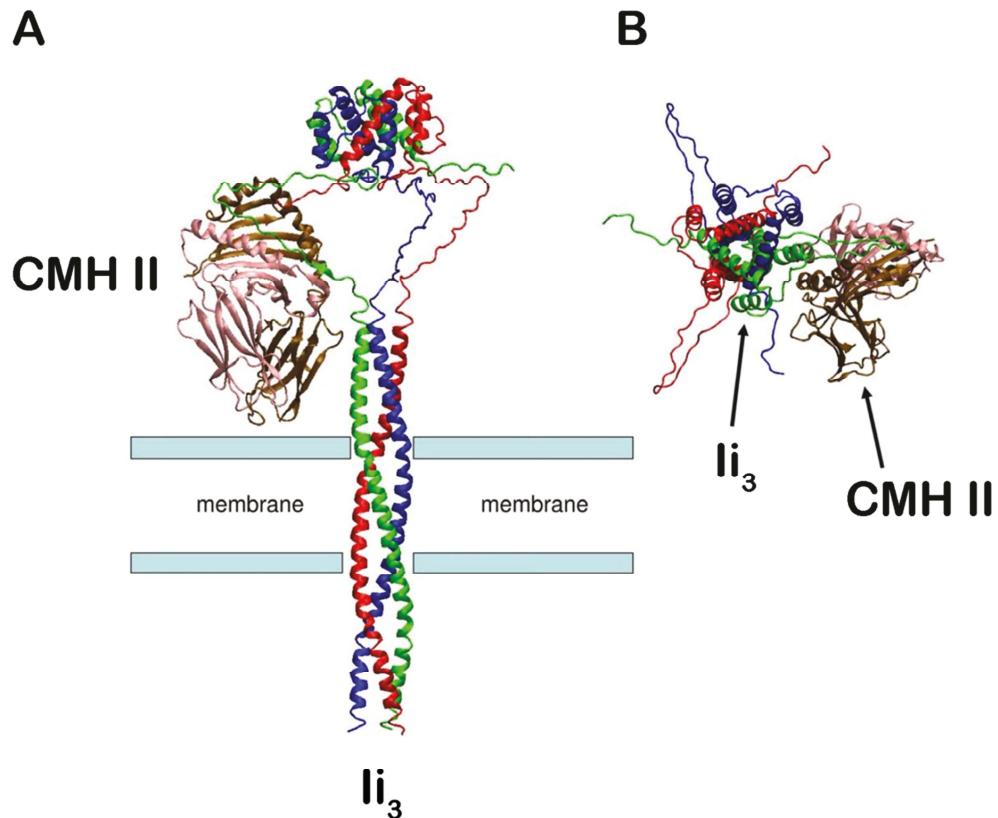
Découlant des deux fonctions décrites ci-dessus, la chaîne invariante a ainsi pour fonction d'assister la sortie du RE vers le Golgi. En effet, en absence d'Ii, le CMH II présente un défaut de transport qui conduit à des niveaux d'expression en surface très réduits, indépendamment de leur capacité à s'assembler en absence d'Ii.<sup>251, 252, 258</sup> Aussi,

ces CMH II qui arrivent à rejoindre la surface sont peu glycosylés, ce qui démontre que la maturation dans le Golgi a été défective.<sup>240, 251</sup> Des études utilisant des li tronqués et des peptides liés covallement dans la niche, ont montré que l'occupation de la niche dans le RE était suffisante pour promouvoir le trafic efficace des CMH II du RE vers le Golgi.<sup>253, 259</sup> Ce phénotype est surtout observé chez les souris ayant le fond génétique H2<sup>b</sup> alors que chez les souris H2<sup>k</sup> et H2<sup>d</sup>, la sortie du RE du CMH II peut avoir lieu en absence d'li.<sup>260</sup>

### 1.3.5. Oligomérisation de la chaîne invariante

Pendant longtemps, il a été accepté qu'un trimère d'li se liait à trois dimères de CMH II pour former un nonamère ( $\alpha\beta\text{li}$ )<sub>3</sub>. L'oligomérisation d'li a été démontrée grâce à des expériences utilisant le pontage artificiel des complexes afin d'éviter leur dissociation et de permettre leur détection.<sup>200, 205, 210, 261</sup> Cependant, ce modèle a été récemment remis en cause par l'équipe de Koch qui a démontré, sans utiliser de pontage, que la formation de nonamère était artéfactuelle et qu'en réalité, le trimère de chaîne invariante lie seulement un dimère  $\alpha\beta$  de CMH II formant un pentamère ( $\alpha\beta$ )<sub>1</sub>(li)<sub>3</sub> (Figure 1-11).<sup>221</sup> Ceci a été confirmé encore plus récemment par Majera et ses collègues.<sup>217</sup> Il faut noter que ces études ont été réalisées en utilisant les isoformes lip33 ou lip31. Hors, une étude dans notre laboratoire a démontré que la formation d'un pentamère ou d'un nonamère dépendait des isoformes d'li présentes dans le complexe (Cloutier *et al*, manuscrit soumis). En effet, les isoformes lip35 possèdent un motif de rétention dans le RE et la sortie de ce compartiment ne peut avoir lieu qu'après liaison au CMH II. Ainsi, chaque lip35 doit se lier à un dimère de CMH II pour permettre la sortie du complexe. Le nombre de dimères de CMH II contenus dans le complexe dépend ainsi du nombre d'isoforme lip35 qui le composent. Ainsi, un trimère contenant un seul lip35 devra former au

minimum un pentamère. Si deux lip35 sont présents il faudra un heptamère  $(\alpha\beta)_2(\text{li})_3$  et la formation d'un nonamère ne sera requise qu'en présence de trois isoformes lip35.



**Figure 1-11 : Modélisation moléculaire d'un complexe li-CMH II pentamérique.**

Le pentamère  $(\alpha\beta)_2(\text{li})_3$  modélisé ici représente une structure possible du complexe formé par un trimère d'li et d'un dimère de CMH II. Dans cette configuration, seuls les domaines extracellulaires des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du CMH II sont représentés (brun). Les trois chaînes invariantes formant le trimère sont représentées dans leur intégralité (vert, bleu et rouge). La figure montre le complexe par une vue latérale (**A**) ou du dessus (**B**). Modifié de<sup>221</sup>.

### 1.3.6. Modifications post-traductionnelles de la chaîne invariante

Après synthèse, la chaîne invariante subit plusieurs modifications. Tout d'abord, dans le RE, elle est glycosylée sur deux résidus asparagine (N-glycosylation) situés entre le

domaine de liaison au CMH II et le domaine de trimérisation (Figure 1-8).<sup>113, 262</sup> Ces deux séquences de liaison de N-glycans sont très conservées. Il a été suggéré que cette glycosylation préviendrait la dégradation d'Ii à pH neutre ce qui contribuerait à la présentation antigénique.<sup>263, 264</sup> Cependant, le rôle précis de cette glycosylation n'est pas complètement compris.

Dans le TGN, certaines molécules d'Ii peuvent acquérir une chaîne latérale de glycosaminoglycan de type chondroitin sulfate (CS), qui s'attache à une sérine (Ser 201 chez la souris et Ser 202 chez l'humain)(Figure 1-8).<sup>265-268</sup> Ces isoformes, appelées Ii-CS ou Ii-CSPG, ont été trouvées associées au CMH II à la surface cellulaire, mais ces complexes ont une demi-vie très courte et représentent seulement deux à cinq pourcent des CMH II en surface.<sup>266</sup> Ces formes sont capables de former des trimères avec les formes conventionnelles d'Ii. Une étude a montré qu'Ii-CS interagirait avec CD44 et augmenterait le signal lors de l'activation des cellules T.<sup>269</sup> Cependant, comme les Ii conventionnels sont aussi capables d'interagir avec CD44,<sup>270</sup> le rôle précis des formes Ii-CS demeure nébuleux mais elles pourraient contribuer à l'expression de surface d'une partie des Ii.

### 1.3.7. Trafic intracellulaire vers les endosomes

Le CMH II est exprimé en surface deux à six heures après sa synthèse. Après le TGN, le CMH II est ciblé dans la voie endocytique et dans les compartiments qui contiennent les peptides à présenter.<sup>118, 271, 272</sup> La chaîne invariante contient, dans la queue cytoplasmique commune à toutes les isoformes, un motif de type di-leucine de ciblage dans les endosomes.<sup>114, 115, 273, 274</sup> En effet, ce motif di-leucine est formé par deux motifs distincts, le premier formé par les résidus en position sept et huit (Leu7 et Ile8) et l'autre par ceux en position 16 et 17 (Met16 et Leu17).<sup>158, 261, 275-277</sup> Lorsque ces motifs sont mutés ou supprimés, la chaîne invariante ou les complexes Ii-CMH II sont exprimés en surface.<sup>114, 115, 273, 278</sup>

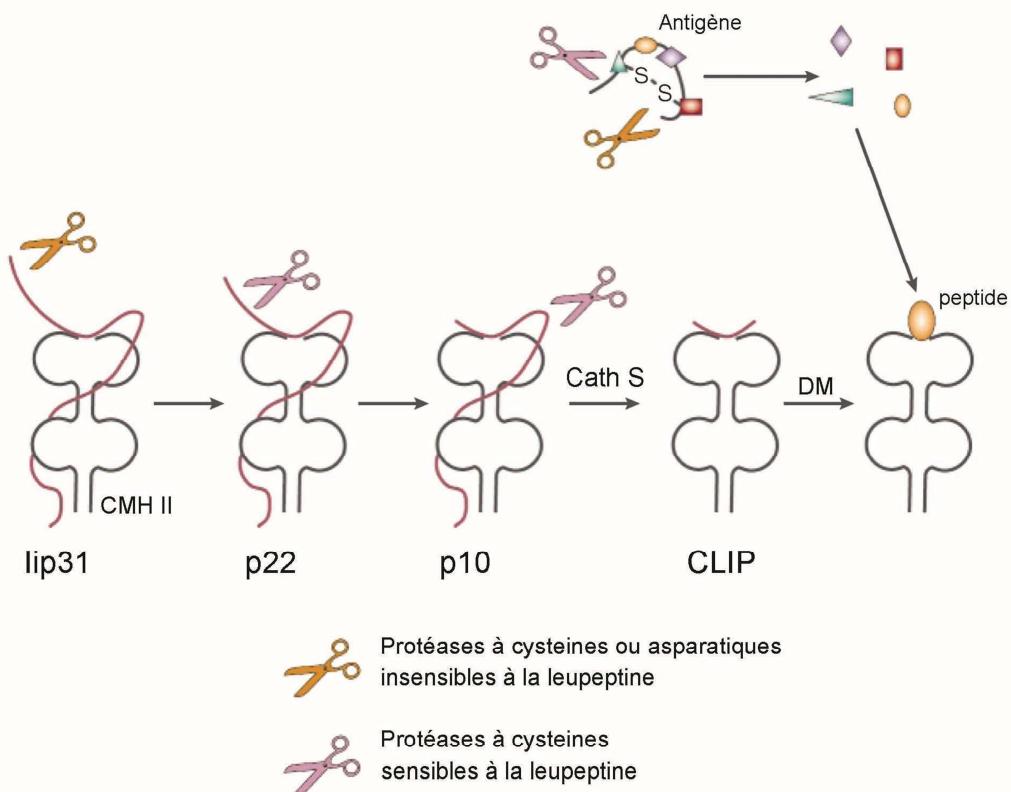
Il faut savoir qu'il existe deux voies d'entrée dans les endosomes qui influencent la disponibilité des différents antigènes. Les complexes peuvent être ciblés directement du TGN aux endosomes.<sup>116, 238, 279-281</sup> Alternativement, ils peuvent être exprimés en surface puis être recyclés dans les endosomes.<sup>158, 281-283</sup> L'importance du recyclage via la surface dépend beaucoup des types cellulaires et de l'état d'activation des cellules. Par exemple, chez les DC et les monocytes humains, la majorité des complexes passe par cette voie de transport.<sup>284</sup> Les deux motifs leucine sont importants pour le ciblage dans les endosomes, mais pour l'endocytose, le motif Met16-Leu17 est moins efficace.<sup>285</sup> Des études ont montré que les résidus à proximité spatiale de ces motifs di-leucine sont importants pour le ciblage, ce qui suggère que les motifs sont reconnus comme faisant partie d'une séquence plus large.<sup>276, 286</sup> En effet, *in vitro*, les motifs di-leucine lient les protéines adaptatrices (AP) AP1 et AP2 qui font partie du manteau de clathrine impliqué dans la formation de vésicule de transport.<sup>287, 288</sup> D'autres études utilisant des mutants dominants négatifs de clathrine ou de dynamine ont confirmé que les vésicules de clathrines sont responsables de l'endocytose des complexes li-CMH II.<sup>283, 289</sup> Plus récemment, il a été démontré que c'est la protéine AP2, et non AP1, AP3 ou AP4, qui était responsable de l'endocytose des complexes li-CMH II par la surface.<sup>290, 290, 291, 291-293</sup>

Même si le rôle du motif di-leucine de la chaîne invariante dans le ciblage aux endosomes est essentiel, des études ont suggéré que le domaine transmembranaire contribuait également à ce ciblage.<sup>158, 277</sup> En effet, Kang et ses collègues ont fusionné deux régions du TM à une protéine servant de rapporteur et ont suivi son transport. Ils ont démontré que les deux régions testées permettaient le ciblage de la protéine dans les endosomes sans affecter son taux d'internalisation.<sup>285</sup> La fonction de ciblage d'li dépend également de sa capacité à oligomériser.<sup>210, 261</sup> Ainsi, on sait que des trimères d'li dépourvus de queue cytoplasmique, et donc de motif di-leucine, sont exprimés en surface. Arneson a montré que la présence d'un seul domaine cytoplasmique valide au

sein du trimère est suffisant pour l'internalisation mais que le ciblage efficace dans la voie endosomale nécessite l'oligomérisation d'Ii.<sup>261</sup>

### 1.3.8. Protéolyse de la chaîne invariante dans les endosomes

Une fois dans les endosomes, la chaîne invariante doit être clivée de manière séquentielle afin de permettre la liaison des peptides antigéniques, ce qui est nécessaire pour l'expression en surface des complexes pCMH II.<sup>294, 295</sup> La chaîne invariante est d'abord clivée en C-terminal pour donner la forme p22 de 22 kDa (ou LIP, *leupeptin-induced peptide*) qui est ensuite clivée en p10 de 10kDa (ou SLIP, *small leupeptin-induced peptide*). Enfin, le p10 est protéolysé en CLIP.<sup>121, 296</sup> Les intermédiaires de dégradation ont une demi-vie très courte et peuvent être observés en utilisant la leupeptine, un inhibiteur de protéases.<sup>219, 297, 298</sup> Lorsque les cellules sont traitées à la leupeptine, on observe une accumulation des formes p22 et p10 montrant que les protéases responsables des premiers clivages sont insensibles à cette drogue, contrairement aux protéases responsables de la conversion de p10 en CLIP (Figure 1-12).<sup>294, 299, 300</sup>



**Figure 1-12 : Dégradation séquentielle d'Ii.**

Tout d'abord, chez la souris, la chaîne invariante lip31 est dégradée en p22 par des protéases à cystéines ou asparatiques qui sont insensibles à la leupeptine. Ensuite, des protéases à cystéines sensibles à la leupeptine clivent p22 en p10. La cathepsine S (Cath S) dégrade le p10 en CLIP qui est ensuite échangé par H2-DM (DM) pour un peptide de forte affinité. Les peptides sont issus de la dégradation des antigènes par plusieurs protéases. Modifié de <sup>301</sup>.

L'acidification des endosomes induit l'activation de plusieurs protéases endosomales telles que les cathepsines.<sup>301-303</sup> De nombreuses études se sont penchées sur le rôle des différentes cathepsines et ont montré que les cathepsines B, D, E, F, K, L et S sont capables de cliver li in vitro.<sup>298, 300, 304</sup> Cependant, des souris knockout ont permis de voir que de nombreuses protéases ne sont pas indispensables in vivo. Par exemple, des souris déficientes en cathepsines B ou D ne présentent pas de défaut de dégradation d'Ii ni de présentation antigénique aux cellules T.<sup>305, 306</sup> Les souris déficientes en cathepsines S et L

ont permis de voir que ces deux protéases sont primordiales et ont des rôles distincts et non redondants dans la dégradation d'Ii et la présentation antigénique. La cathepsine L n'est pas exprimée sous sa forme active dans les DC ou les cellules B<sup>307</sup> mais l'est très fortement dans le thymus et en particulier dans les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC).<sup>308-311</sup> Chez l'humain et la souris, cette protéase est responsable de la dégradation d'Ii et de la génération d'épitopes nécessaires pour la sélection positive des cellules T.<sup>308, 309, 311, 312</sup> Les cTEC déficientes en cathepsine L ont une accumulation des intermédiaires p22 et p10 conduisant à un défaut de sélection thymique et à un répertoire peptidique altéré. Par contre, dans les APC, on n'observe pas cette accumulation ce qui démontre la spécificité de cette protéase pour les cTEC.<sup>309</sup> La deuxième cathepsine primordiale est la cathepsine S. Elle est exprimée, à l'inverse de la cathepsine L, surtout dans les APC professionnelles comme les DC et les cellules B et elle est également importante pour la génération des peptides.<sup>313-315</sup> Elle est responsable du clivage du fragment p10 en CLIP et son absence cause une accumulation des intermédiaires p22 et p10 ainsi qu'une déficience dans la présentation antigénique.<sup>122, 314, 315</sup> Contrairement aux cellules B et aux DC, les macrophages expriment les deux cathepsines S et L sous leurs formes actives ce qui a permis de voir que la cathepsine L peut compenser partiellement la perte de la cathepsine S.<sup>316, 317</sup> Cependant, ces résultats demeurent controversés.<sup>307, 318</sup>

Les tentatives d'identification de protéases responsables du clivage d'Ii ont permis, entre autre, de découvrir la cathepsine F ainsi que l'endoprotéase AEP (*asparaginyl cysteine endoprotease*). In vitro, la cathepsine F recombinante est aussi efficace que la cathepsine S pour cliver p10 en CLIP ce qui suggère que ces deux protéases sont redondantes.<sup>318-320</sup> Cependant, il reste à prouver que c'est bien ce qu'il se passe in vivo. L'AEP, identifiée dans les cellules B humaines initie un premier clivage qui rend les autres sites de clivages visibles pour les protéases.<sup>321, 322</sup> Elle est insensible à la leupeptine et

prend part aux premiers clivages d'li mais son rôle, contrairement aux cathepsines S et L, est redondant avec d'autres protéases, comme par exemple la cathepsine G.<sup>321, 323-325</sup>

Il faut noter que les cathepsines S et L, en plus d'être en charge de la dégradation d'li, joueraient un rôle dans la génération de peptides antigéniques mais il est difficile de savoir sans ambiguïté si ce changement est dû à un effet direct de l'apprêtage des antigènes ou au défaut de dégradation d'li. Les souris doublement déficientes en cathepsine L et li ont un répertoire de peptide plus réduit que celui des souris li-KO.<sup>176, 326, 327</sup> De plus, même si la génération du pool de peptide n'est pas affectée par l'absence des deux cathepsines, le niveau de présentation de certains antigènes spécifiques varie.<sup>325</sup> Tous ces résultats suggèrent que les deux protéases ont une influence sur l'apprêtage des antigènes.

### 1.3.9. Régulation de la protéolyse par l'isoforme lip41

On a vu que la forme lip41 dispose d'une région lumineuse supplémentaire résultant de l'épissage alternatif de l'exon 6b.<sup>198</sup> Cette isoforme lip41 peut imposer le profil de dégradation à lip31 lorsqu'elles sont co-exprimées et elle est plus résistante à la protéolyse ce qui augmente sa demi-vie.<sup>328-330</sup> On sait que la chaîne invariante est dégradée, entre autre, par la cathepsine L. Cette protéine est synthétisée sous forme de pro-enzyme inactive dont le site actif est bloqué et doit subir plusieurs clivages afin de se libérer pour constituer la forme mature.<sup>331, 332</sup> Le fragment additionnel d'lip41 peut se lier de manière non covalente au site actif de la cathepsine L mature et bloquer ainsi son activité.<sup>333-335</sup> In vitro, cette liaison provoque l'inhibition de l'activité enzymatique de la cathepsine L.<sup>336, 337</sup> Des études plus récentes suggèrent qu'lip41 aurait un rôle de chaperon pour la cathepsine L. En effet, chez les souris déficientes en chaîne invariante, l'expression et l'activité de la cathepsine L sont fortement réduites à cause de la dégradation de cette dernière ce qui suggère qu'lip41 stabilise la cathepsine L et la protège de la dégradation précoce.<sup>338</sup> Ainsi, lip41 permettrait le maintien du pool

d'enzyme dans les endosomes.<sup>338</sup> Il a également été suggéré qu'lip41, en stabilisant la cathepsine L extracellulaire, régulerait la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire.<sup>333, 339-341</sup> Il a récemment été démontré qu'lip41 était capable, *in vitro*, de réguler et bloquer l'activité d'un groupe de protéases cystéines et pas seulement la cathepsine L. Elle pourrait avoir une spécificité d'action plus vaste qu'initialement suggérée.<sup>342</sup>

### **1.3.10. Les rôles de la chaîne invariante reliés au CMH II**

On a vu dans les chapitres précédents que la chaîne invariante a de nombreux rôles liés au CMH II. Elle assiste le repliement du CMH II, prévient la liaison indésirable de peptides et cible les complexes dans les endosomes pour permettre la liaison de peptides de forte affinité et la présentation subséquente aux cellules T CD4+.<sup>202, 256, 343</sup> Ainsi, la chaîne invariante a un rôle primordial dans le trafic du CMH II et la présentation antigénique. Les souris et cellules déficientes en chaîne invariante présentent de nombreux défauts. Dans le RE, le CMH II forme des agrégats et les molécules qui parviennent à sortir du RE ont une conformation non compacte qui est caractéristique des CMH II vides ou liés à des peptides de faible affinité.<sup>251, 252, 344</sup> Ce phénotype est beaucoup plus dramatique chez les souris H-2<sup>b</sup> que chez les souris H-2<sup>k</sup> et H-2<sup>d</sup>.<sup>258</sup> Il y a également une sérieuse réduction du CMH II à la surface.<sup>240, 251, 252, 344</sup> Conséquemment, il y a un défaut dans la présentation antigénique pour les antigènes dépendants d'Ii. Par exemple, *in vitro*, les souris ou cellules déficientes en chaîne invariante sont inaptes à présenter les antigènes HEL, KLH ou OVA à des hybridomes T spécifiques.<sup>240, 251, 252, 345, 346</sup> *In vivo*, suite à des immunisations, les souris sont également incapables de produire rapidement des anticorps.<sup>251</sup> De plus, ces animaux ont une réponse immunitaire déficiente face à une infection virale.<sup>347</sup> Les souris IiKO ont également une réponse Th2 altérée.<sup>348</sup> De plus, le CMH II et Ii sont responsables de la sélection positive thymique des cellules T CD4+. Par

conséquent, les souris liKO présentent un défaut de sélection thymique ce qui aboutit à un nombre restreint de cellules T CD4+ au niveau central et périphérique. Ces cellules T expriment une quantité moindre de TCR à leur surface. De plus ces souris possèdent un répertoire de peptides altéré.<sup>251, 252, 349, 350</sup> Par contre, même une faible expression du CMH II permet de restaurer la sélection thymique.<sup>351</sup>

Enfin, il a été démontré que les isoformes lip31 et lip41 sont équivalentes dans plusieurs fonctions. En effet, ces deux protéines, exprimées individuellement, sont capables de restaurer l'expression du CMH II en surface, la sélection thymique et la présentation antigénique.<sup>344-346, 352, 353</sup>

### **1.3.11. Les rôles de la chaîne invariante indépendants du CMH II**

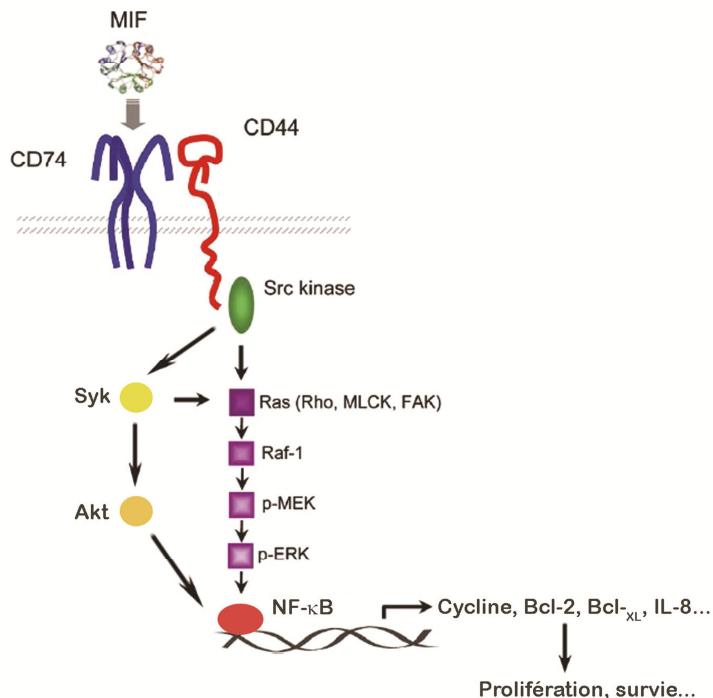
La chaîne invariante peut être exprimée à la surface indépendamment du CMH II suggérant ainsi d'autres rôles que ceux décrits précédemment. En effet, de nombreuses études récentes ont démontré que la chaîne invariante est une protéine pléiotropique qui a des fonctions nombreuses et variées.

#### **1.3.11.1. Le rôle d'li comme récepteur du MIF**

Le MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) est une cytokine sécrétée par quasiment toutes les cellules et qui a initialement été découverte comme facteur inhibant la migration des macrophages.<sup>354</sup> Cette protéine a un rôle central dans l'immunité innée et adaptative. C'est une cytokine pro-inflammatoire qui induit l'activation des monocytes et macrophages de même que l'expression de plusieurs autres cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF $\alpha$ , l'IL-6 ou l'IL-8.<sup>355-358</sup> Elle est aussi requise pour l'activation des cellules T et la production d'anticorps *in vivo*.<sup>358-361</sup> Conséquemment, le MIF a été associé à plusieurs cancers et désordres immuns. Il est surexprimé dans plusieurs cancers solides, en particulier les cancers primaires du sein, et sa surexpression est associée à la

progression tumorale.<sup>362, 363</sup> Il est aussi lié à l'angiogénèse dans les cancers du colon.<sup>364</sup> Les thérapies anti-MIF ont montré une suppression de la croissance tumorale.<sup>365</sup>

Récemment, le récepteur du MIF à la surface cellulaire a été identifié. Il s'agit de la chaîne invariante. En effet, MIF lie le domaine extracellulaire d'Ii avec une forte affinité ce qui fait de lui son ligand naturel.<sup>366</sup> Cette interaction active la voie des MAP kinases (MAPK) ERK1/2 et la voie passant par PI3K et Akt ce qui aboutit à la prolifération cellulaire, la production de PGE<sub>2</sub> ainsi qu'à l'augmentation de la survie et l'expression d'IL-8.<sup>357, 366-369</sup> Le blocage de la chaîne invariante conduit à l'inhibition de certaines fonctions de MIF telles que l'arrêt des monocytes ou la production de cytokines.<sup>370, 371</sup> MIF et Ii ont également un rôle dans le recrutement et l'adhésion des leucocytes sur le site de l'inflammation.<sup>372</sup> Il a ensuite été démontré que la protéine CD44 fait partie intégrante du récepteur du MIF formé par Ii.<sup>270, 373</sup> En effet, même si le MIF peut lier Ii en absence de CD44, ce dernier est nécessaire pour l'initiation de la cascade de signalisation intracellulaire qui requiert également la tyrosine kinase Src.<sup>270</sup> Ainsi, Ii et CD44 sont tous deux nécessaires pour l'inhibition de l'apoptose et la prolifération cellulaire induite par MIF (Figure 1-13).<sup>373, 374</sup> Par ailleurs, une ancienne étude avait montré que les formes chondroitines sulfate d'Ii étaient associées à CD44 en surface.<sup>269</sup> Cependant, dans les études récentes, la liaison à CD44 et MIF ne semble pas être restreinte à ces formes d'Ii.



**Figure 1-13 : Voie de signalisation induite par la liaison de MIF sur le complexe CD74/CD44.**

Le MIF se lie sur le complexe récepteur formé par li (CD74) et CD44. La liaison induit une cascade de signalisation qui requiert Src et qui passe par la voie des MAPK ou Syk/Akt et qui conduit à l'activation de NF-κB. Ce dernier active la transcription des gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. Modifié de <sup>270</sup>.

### 1.3.11.2. Le rôle d’li comme partenaire de CXCR2 et CXCR4

Le MIF peut se lier à trois différents récepteurs : CD74 (li), CXCR2 ou CXCR4.<sup>366, 370</sup> CXCR2 est le récepteur de l’IL-8 (CXCL8) et il est impliqué dans l’angiogénèse et les cancers.<sup>375</sup> CXCR4 est le récepteur de CXCL12 et est impliqué dans le processus inflammatoire et la génération de métastases.<sup>375-377</sup> Des études récentes suggèrent que la chaîne invariante pourrait être impliquée dans les complexes MIF/CXCR2 ou MIF/CXCR4. En effet, l’équipe de Bernhagen a montré que CXCR2 se lie à li sur les monocytes pour former un complexe servant de récepteur fonctionnel qui lierait le MIF, causant ainsi le

recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation.<sup>370</sup> Cependant, le rôle de CXCR2 dans ce contexte doit être investigué plus en détail. Quant à CXCR4, une étude a démontré qu'il s'associe également avec li, in vitro, en un complexe servant de récepteur qui répond au MIF.<sup>378</sup> Le blocage de CXCR4 abroge la cascade de signalisation induite par MIF et li.<sup>379</sup> Cependant, il n'est pas clair si CD44 est impliqué dans ce cas-ci. De plus, MIF serait aussi capable, via le complexe CD74/CXCR4, d'induire la voie de signalisation passant par JNK et conduisant à la production d'IL-8.<sup>380-382</sup> Ces découvertes assez récentes montrent les rôles divers de la chaîne invariante mais méritent d'être étayées, en particulier *in vivo*.

### 1.3.11.3. Le rôle d'Ii dans la maturation des cellules B

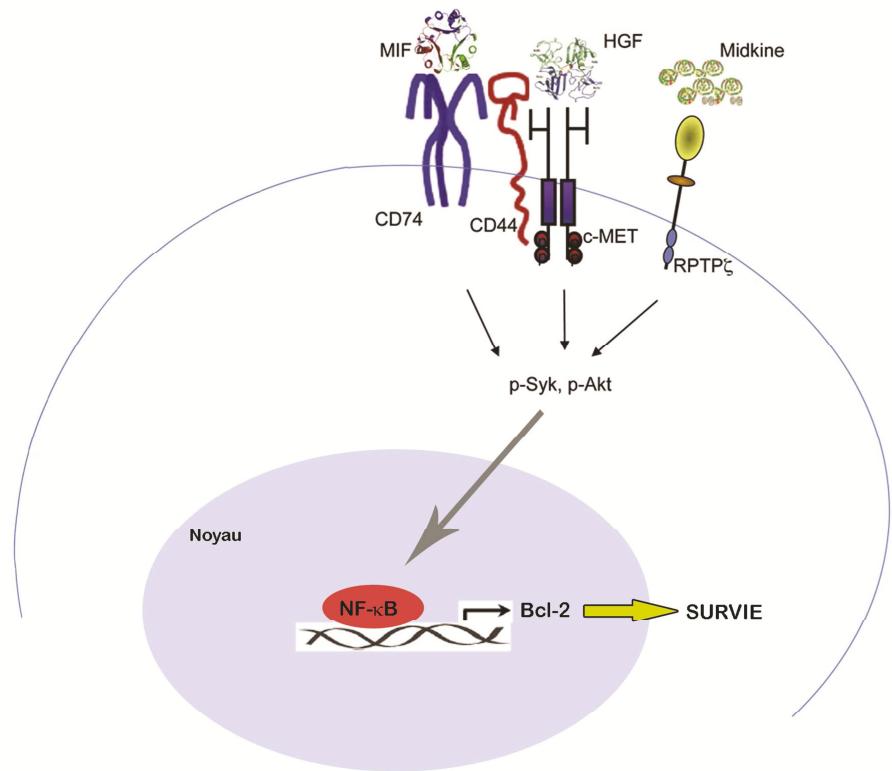
Les cellules B commencent leur développement dans la moelle osseuse. S'ensuivent différents stades de développement, dans la moelle puis la périphérie, au cours desquels le niveau d'expression des protéines de surface est modulé. On peut ainsi identifier les différents stades de maturation des cellules B grâce à leurs marqueurs de surface. De manière simplifiée, dans la moelle, on observe les cellules précurseurs pré-pro-B ( $B220^+$ ,  $CD19^-$ ), puis les cellules pro-B et pré-B ( $B220^+$ ,  $CD19^+$ ) et enfin les cellules immatures ( $B220^+$ ,  $CD19^+$ ,  $IgM^+$  et  $IgD^-$ ).<sup>383, 384</sup> En périphérie, les cellules expriment toutes CD19 et on trouve les cellules immatures T1 (ou NF, *newly formed*) qui ont le phénotype  $IgM^{high}$ ,  $IgD^{low}$ ,  $CD21^{-/low}$  et  $CD23^-$ . Ensuite, les T2 sont  $IgM^{high}$ ,  $IgD^{high}$ ,  $CD21^+$  et  $CD23^+$ . Enfin ces cellules se différencient en cellules folliculaires (FO)  $IgM^{low}$ ,  $IgD^{high}$ ,  $CD21^{int}$  et  $CD23^+$  ou marginales (MZ)  $IgM^{high}$ ,  $IgD^{low}$ ,  $CD21^{high}$  et  $CD23^-$ .<sup>385, 386</sup>

Les souris déficientes en chaîne invariante ont permis de montrer le rôle d'Ii dans le développement des cellules B. En effet, ces souris présentent un nombre restreint de cellules B matures.<sup>344, 387-389</sup> Aujourd'hui, de nombreuses études, provenant essentiellement du laboratoire de Shachar, ont permis d'en élucider le mécanisme. Ce

dernier nécessite li mais son action ici est indépendante de son rôle de chaperon.<sup>390</sup> En effet, ils ont montré que MIF se lie en surface au complexe CD74/CD44, ce qui induit une cascade de signalisation qui implique les protéines Syk et Akt qui activent le facteur de transcription NF-κB p65/RelA ainsi que son coactivateur TAF<sub>II</sub>105.<sup>374, 391</sup> L'activation de cette cascade conduit à l'entrée en phase S des cellules B avec une augmentation de la division cellulaire et l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-XL.<sup>374, 392</sup> De plus, p65 va également activer la protéine TAp63 qui active l'expression de BCL-2 qui, à son tour, induit la survie cellulaire.<sup>393</sup> Il agit donc comme un récepteur de survie qui conduit, *in fine*, à la survie et la prolifération cellulaire des cellules B.<sup>374, 392</sup> Par ailleurs, ils ont démontré que la portion N-terminale, formée par les résidus 1-82 d'li, serait suffisante pour activer NF-κB et provoquer la maturation des cellules B.<sup>390</sup> La chaîne invariante serait ainsi protéolysée au niveau de la membrane et le fragment 1-82, alors actif, serait relâché et activerait NF-κB et la cascade subséquente.<sup>394</sup> Les souris transgéniques n'exprimant que ce fragment d'li présentent des proportions de cellules B identiques aux animaux WT. Cependant, dans ce cas, il n'y a pas de stimulation par MIF en surface laissant la place aux spéculations quant au mécanisme qui provoque le clivage et le transport du fragment 1-82. Shachar et ses collaborateurs ont également démontré que les cellules de patients ayant une leucémie lymphocytique chronique (CLL) expriment de plus forts niveaux d'li que les cellules saines. Dans ces cellules cancéreuses, lorsque CD74 est activé par MIF, la cascade d'activation passant par NF-κB conduit à la sécrétion d'IL-8 qui induit la survie des cellules et ainsi contribue à la progression tumorale.<sup>357</sup> Toujours dans les cellules B, la protéine TAp63, activée par la voie MIF/li, va induire l'expression de l'intégrine VLA-4. Cette dernière favorise le retour des cellules B dans la moelle osseuse ce qui leur permet d'échapper à l'apoptose.<sup>395</sup> L'axe CD74/NF-κB/TAp63 est donc une voie anti-apoptotique qui forge le répertoire des cellules B.

Deux nouveaux mécanismes impliqués dans l'homéostasie des cellules B ont été récemment identifiés par l'équipe de Shachar. Tout d'abord, la voie impliquant le facteur

de croissance des hépatocytes (HGF) et son récepteur c-Met. L'activation de c-Met par HGF conduit à une cascade qui induit la survie des cellules. De plus, c-Met est recruté par MIF au complexe CD44/CD74 ce qui est nécessaire pour l'induction du signal par cette voie et qui aboutit à l'expression de c-Met lui-même et à la production d'HGF. Il y a ainsi une stimulation de la survie des cellules de manière autocrine.<sup>396</sup> Ensuite, une autre cytokine est impliquée dans la maturation des cellules B, la cytokine midkine (MK) qui agit via son récepteur RPTP $\zeta$ . La stimulation de MIF sur CD74 active c-Met qui induit l'expression de MK qui, à son tour, stimule la cascade de survie des cellules B saines ou issues de patients ayant une CLL (Figure 1-14).<sup>397</sup> En outre, la voie MIF/CD74 est impliquée dans le lupus érythémateux systémique (SLE). Chez les souris atteintes de SLE, les protéines MIF, CD74 et CD44 sont surexprimées dans les cellules B, les reins et l'hippocampe cérébral. Lorsque les cellules sont traitées avec un peptide tolérogénique qui réduit leur expression, la survie des cellules B est diminuée et les symptômes sont moins dramatiques.<sup>398</sup> On voit bien, grâce à ces études, qu'il est un récepteur de survie qui induit la prolifération et la maturation des cellules B saines et anormales.



**Figure 1-14 : Induction de la survie des cellules B via plusieurs cytokines et CD74.**

Le MIF se lie sur le récepteur formé par li et CD44. La cytokine HGF se lie sur son récepteur c-Met qui est recruté au complexe CD74/CD44 par MIF. La cytokine midkine se lie à son récepteur RPTP $\zeta$ . La liaison de ces cytokines sur leur récepteur induit une cascade de signalisation qui est dépendante d'li et qui conduit à l'activation de NF- $\kappa$ B et à la transcription des gènes de survie et de prolifération cellulaire. Modifié de <sup>399</sup>.

Pour ce qui est des cellules B, des études plus anciennes avaient proposé que les défauts observés chez les souris liKO étaient en réalité la conséquence de la toxicité des chaînes  $\beta$  du CMH II qui forment des agrégats en absence d'li.<sup>400</sup> Les souris déficientes en chaîne  $\alpha$  du CMH II présentent une maturation de cellules B altérée alors que les souris déficientes pour la totalité du CMH II ont un phénotype normal.<sup>401</sup> De plus, les souris doublement déficientes pour li et le CMH II ont des compartiments de cellules B normaux.<sup>402, 403</sup> L'équipe de Bendelac suggère que la réduction du nombre de cellules

folliculaires matures (FO) n'est pas due à un blocage de la maturation mais à une réduction de leur durée de vie causée par la toxicité des chaînes  $\beta$  du CMH II.<sup>403</sup> D'autres études sont nécessaires pour clarifier le rôle exact d'Ii et du CMH II dans le développement des cellules B.

#### 1.3.11.4. Le rôle d'Ii dans l'inflammation et les cancers

On vient de voir que MIF est une cytokine inflammatoire et que sa liaison sur Ii induit une cascade de signalisation conduisant à la prolifération et la survie cellulaire. On devine donc bien le rôle que peut avoir Ii dans l'inflammation et les cancers.

L'expression d'Ii dans le tractus gastro-intestinal (GI) ne se cantonne pas aux APC. En effet, Ii est exprimé dans les cellules épithéliales gastriques et les cellules intestinales.<sup>404, 405</sup> Ii et MIF sont fortement exprimés lors de l'inflammation présente dans la maladie de Crohn, les colites ulcérvatives ou associée aux cancers gastriques.<sup>406-409</sup> Dans le tractus GI, MIF, via Ii, induit la voie de signalisation conduisant à la production d'IL-8 qui, en plus de contribuer à l'inflammation, induit l'expression d'Ii aggravant ainsi l'inflammation.<sup>357, 410, 411</sup> Ii est aussi possiblement impliqué dans le développement et la progression des cancers. Il est surexprimé dans plusieurs cancers<sup>373, 408, 412, 413</sup> et jouerait un rôle dans la production de métastases.<sup>414</sup> Il a été suggéré que l'expression d'Ii dans les tumeurs solides pourrait servir d'outil pronostic, l'intensité de l'expression corrélant avec la sévérité de la maladie.<sup>415</sup> Les forts niveaux d'Ii pourraient prévenir la présentation d'antigènes tumoraux ce qui rendrait la tumeur moins immunogénique comme c'est le cas pour certains cancers du côlon.<sup>407</sup> Ensuite, la liaison du MIF, souvent surexprimé aussi dans les cancers, induit des cascades de signalisation conduisant à la prolifération et la survie cellulaire comme c'est le cas pour les cellules B.<sup>416</sup> Les essais cliniques préliminaires utilisant un anticorps dirigé contre Ii (Milatuzumab ou hLL1) ont montré que ce dernier

inhibait la croissance cellulaire et induisait l'apoptose. Cet anticorps est donc un candidat potentiel pour de futures thérapies contre les cancers de cellules B.<sup>417</sup>

### 1.3.11.5. Le rôle d'Ii comme récepteur de *Helicobacter pylori*

La chaîne invariante est surexprimée dans les cellules épithéliales gastriques (CEG) lors de l'infection à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) et les niveaux de MIF sont également augmentés.<sup>408, 418</sup> En fait, Ii est utilisé comme récepteur par *H. pylori* pour permettre son adhésion sur les CEG ce qui est essentiel pour la propagation de l'infection et la persistance de la bactérie.<sup>419, 420</sup> C'est l'uréase de *H. pylori* qui lie CD74 en surface.<sup>421</sup> La bactérie injecte ensuite la protéine CagA dans les CEG ce qui induit NF-κB et la production d'IL-8 et de MIF qui vont exacerber l'inflammation.<sup>410, 422</sup> Suite à l'adhésion d'*H. pylori* dans les CEG, l'expression d'Ii à la surface est augmentée.<sup>418, 423</sup> *H. pylori* est également associé aux cancers gastriques<sup>424</sup> et il a été classé comme carcinogène.<sup>425</sup> Il a donc un rôle dans l'action de MIF et d'Ii dans les cancers et l'inflammation.

### 1.3.11.6. Le rôle d'Ii comme chaperon de HLA-DM

La molécule HLA-DM (DM) est une molécule non classique du CMH II qui catalyse l'échange du CLIP pour un peptide forte affinité. Il a été décrit qu'Ii s'associe avec DM et favorise le ciblage de ce dernier dans les endosomes,<sup>426-428</sup> même si les queues cytoplasmiques de DM possèdent un motif tyrosine qui assure le ciblage même en absence d'Ii.<sup>427, 428</sup> Dans les souris déficientes en chaîne invariante, l'expression de DM est réduite.<sup>344, 429</sup> Il avait d'abord été suggéré qu'Ii inhibait la dégradation de DM.<sup>429</sup> Cependant, dans une étude plus récente, Koonce et ses collaborateurs ont montré qu'une inhibition de la dégradation par la lactacystine ne rétablissait pas l'expression de DM, rejetant ainsi cette hypothèse. De plus, chez les souris exprimant seulement l'une ou l'autre des isoformes Iip31 et Iip41, l'expression de DM est similaire à celle des souris

sauvages. Ils suggèrent alors qu'ils agit comme chaperon de DM de manière indépendante à son rôle dans le transport du CMH II. Ils suggèrent qu'ils faciliterait l'assemblage des chaînes de DM, la sortie du RE et la stabilisation du complexe dans les endosomes.<sup>344</sup>

#### 1.3.11.7. Le rôle d'Ii dans la mobilité des DC

Lorsque les DC rencontrent un antigène, elles migrent dans les organes lymphoides secondaires. Ce mouvement est réalisé grâce à des contractions d'actomyosine.<sup>430</sup> On sait qu'ils interagit avec CD44<sup>270</sup> et il a été démontré qu'il s'associe aussi avec le moteur de myosine II qui contrôle les contractions d'actomyosine.<sup>431</sup> Ceci pointe un rôle éventuel d'Ii dans la migration des DC. En effet, l'équipe de Lennon-Dumenil a montré que les DC dépourvus d'Ii avaient un défaut de migration.<sup>432</sup> Les DC sauvages alternent entre des mouvements rapides et lents alors que les DC déficientes en Ii ont une mobilité plus rapide et plus uniforme. De plus, dans les DC activées, il y a une augmentation de l'association d'Ii avec la myosine II. La chaîne invariante est donc un régulateur de la mobilité des DC. Ce mécanisme permettrait aux cellules non activées de migrer rapidement afin de maximiser les chances de rencontrer un antigène. Inversement, les cellules activées réduisent ainsi leur mobilité afin de faciliter la présentation aux cellules T.

#### 1.3.11.8. Le rôle d'Ii comme cible du VIH

Des études récentes ont établi un lien entre la chaîne invariante et le VIH (virus de l'immunodéficience humaine). Tout d'abord, la protéine Nef du VIH interagit avec Ii et induit l'accumulation de ce dernier en surface.<sup>433, 434</sup> Cette induction d'Ii par Nef est observée avec plusieurs virus tels que VIH-1, VIH-2 et SIV, *in vitro* et *in vivo*.<sup>433-437</sup> L'amplitude de l'expression d'Ii corrèle avec la progression de la maladie, les faibles niveaux d'Ii étant retrouvés chez les patients non progresseurs à long terme.<sup>436, 437</sup> Le

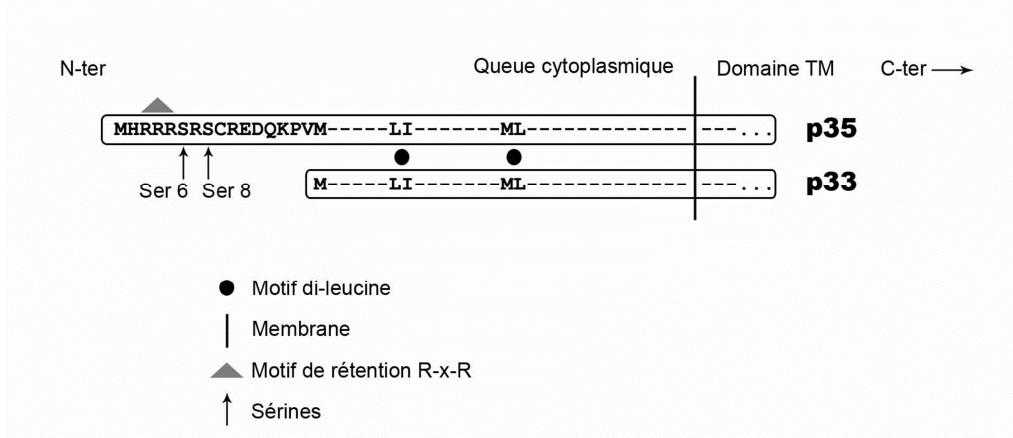
mécanisme par lequel Nef augmente l'expression de surface d'Ii est une compétition entre les deux protéines pour la liaison à AP2. Ainsi, la liaison de Nef à AP2 bloque l'internalisation d'Ii par ce dernier, ce qui conduit à une accumulation à la surface.<sup>438, 439</sup> In vivo, chez les patients infectés par le VIH, Nef augmente aussi les niveaux d'expression d'Ii en surface et ces niveaux corrèlent avec l'activation des cellules B et T CD4+. Les cellules activées ont une plus grande permissivité au virus<sup>440</sup> donc l'accumulation d'Ii causée par Nef contribue à la persistance de la maladie.<sup>441</sup> La protéine Vpu, qui est une protéine accessoire du VIH et qui augmente la relâche virale, se lie également à Ii.<sup>442</sup> Les deux protéines interagissent via leurs domaines cytoplasmiques respectifs. In vivo, Vpu réduit les niveaux de CMH II à la surface et atténue l'activation des cellules T.<sup>442</sup> Le mécanisme doit être élucidé et le rôle d'Ii dans celui-ci doit être identifié plus précisément. Ensuite, la glycoprotéine 41 (gp41) du VIH, qui induit l'entrée du virus dans les cellules, interagit avec plusieurs protéines de la cellule hôte. Gp41 interagit avec le domaine extracellulaire d'Ii dans les cellules infectées ce qui induit la voie de signalisation de ERK/MAPK et aboutit, *in fine*, à l'augmentation de l'infection.<sup>443</sup> Enfin, la protéine Vpx du VIH-2 interagit également avec l'extrémité du domaine extracellulaire d'Ii et plus précisément avec les 82 acides aminés situés en C-terminal.<sup>444</sup> De plus, l'expression de Vpx dans des cellules infectées cause une réduction de l'expression d'Ii, probablement due à une augmentation de sa dégradation. La protéine Vpx réduit donc l'expression d'Ii pour permettre au virus d'échapper au système immunitaire.

La chaîne invariante semble donc être une cible de premier plan du VIH et a un rôle dans la persistance de l'infection.

### 1.3.12. Le cas particulier de l'isoforme lip35

Les deux ARNm codant Ii ont chacun un site alternatif d'initiation de la traduction conduisant à la synthèse des formes lip35 et lip43. Ces deux protéines possèdent une extension de 16 acides aminés de la queue cytoplasmique (voir section 1.3.2).<sup>196</sup> Ces deux

isoformes sont exprimées uniquement chez l'homme.<sup>198</sup> La forme lip43 étant mineure et très peu abondante, nous nous intéressons ici à la forme lip35. Cette dernière représente environ 20% de la totalité des molécules de chaîne invariante.<sup>112, 196, 200</sup> L'extension de la queue de lip35 contient un motif de rétention dans le RE de type di-arginine R-x-R (Figure 1-15).<sup>115, 445</sup>



**Figure 1-15 : Extension de la queue cytoplasmique d'lip35.**

L'extension de la queue cytoplasmique d'lip35 fait 16 acides aminés de long. Elle contient un motif di-arginine R-x-R (triangle gris) de rétention dans le RE ainsi que deux sérines en position 6 et 8 (flèches verticales). Le motif R-x-R est masqué lors de la liaison du CMH II avec lip35 et les deux sérines sont phosphorylées. Ces deux actions sont nécessaires pour la sortie des complexes du RE. Les ronds symbolisent le motif di-leucine de ciblage aux endosomes qui est commun aux deux isoformes lip33 et lip35.

Ce motif agit de manière dominante puisque les trimères mixtes contenant, ne serait-ce qu'une seule forme lip35, sont retenus dans le RE.<sup>112, 205, 330</sup> La sortie du RE est possible lorsque le CMH II se lie au trimère de chaîne invariante et que la queue cytoplasmique de la chaîne β du CMH II masque le motif R-x-R.<sup>446</sup> De plus, une queue cytoplasmique du CMH II de seulement trois acides aminés de long est suffisante pour masquer efficacement le motif et permettre la sortie du RE.<sup>447</sup> L'extension N-terminale d'lip35 contient également deux sérines en position six et huit, qui peuvent être

phosphorylées par la famille des protéines kinases C (PKC).<sup>201, 448, 449</sup> Cette phosphorylation est requise pour la sortie du RE.<sup>450</sup> Ainsi, une activation des PKC, par la PMA par exemple, augmentera la phosphorylation d'li aboutissant à l'augmentation de sa protéolyse et du chargement de peptide dans les MIIC.<sup>449</sup> Inversement, un mutant d'li ne pouvant pas être phosphorylé conduit à une dégradation et un transport défectueux.<sup>201</sup> De plus, contrairement à lip33, la chaîne invariante lip35 ne s'accumule pas à la surface puisqu'elle est internalisée très rapidement.<sup>194, 283</sup>

Le rôle physiologique du motif R-x-R demeure nébuleux mais plusieurs équipes ont suggéré que la modification du ratio lip33/lip35 pourrait avoir des conséquences sur le chargement de peptides, la sortie du RE et la localisation dans les compartiments intracellulaires. En effet l'équipe de Cresswell, qui a suivi les intermédiaires protéolytiques d'lip33 et lip35, a montré que ces fragments pouvaient être différenciés car ils avaient un point isoélectrique différent.<sup>451</sup> On peut spéculer que les deux isoformes pourraient être transportées différemment et pourraient avoir une capacité différente à promouvoir le chargement de peptide sur le CMH II. Il a également été démontré que l'expression anormale d'lip35 était associée à plusieurs pathologies. En effet, dans les cellules B de patients diabétiques, lip35 est sous-exprimé ce qui cause une augmentation du transport du CMH II ainsi qu'une glycosylation inadéquate et une présentation antigénique déficiente.<sup>452</sup> La transfection d'lip35 dans ces cellules anormales permet le rétablissement du transport du CMH II et de la présentation antigénique, ce qui suggère un effet direct d'lip35 sur ces fonctions. Ainsi, lip35 pourrait contribuer au développement du diabète de type 1. De plus, il a déjà été démontré qu'il est surexprimé dans les cellules de patients atteints de CLL.<sup>453</sup> Une autre étude a démontré que les cellules issues de CLL exprimaient plus d'lip35 que leurs homologues saines.<sup>454</sup> Ainsi, la dérégulation du ratio lip33/lip35 pourrait être caractéristique de ce désordre néoplasique. Enfin, comme les formes lip33 et lip35 sont exprimées à des niveaux différents, on peut spéculer sur un éventuel mécanisme de contrôle de la traduction. Ainsi, la forme lip35 a un effet particulier sur le

transport du CMH II et la présentation antigénique et son expression anormale est associée à des pathologies.

#### 1.4. Hypothèses et objectifs

La chaîne invariante joue un rôle clé dans la présentation antigénique. Elle a un impact sur le transport et l'expression du CMH II, la présentation antigénique et la sélection thymique. Elle assure aussi d'autres fonctions indépendantes du CMH II comme la maturation des cellules B, la mobilité des DC ou encore l'adhésion de *H. pylori* ou du VIH sur les cellules. L'isoforme lip35 est particulière par son motif de rétention dans le RE et a un impact particulier sur le transport du CMH II et des autres isoformes d'Ii. De plus, son expression anormale est observée dans plusieurs pathologies. Cependant, bien que la chaîne invariante ait été découverte il y a plus de 30 ans, très peu d'études se sont penchées sur l'isoforme lip35 et de nombreuses questions restent sans réponse. En particulier le rôle physiologique du motif de rétention d'lip35 demeure nébuleux. Notre hypothèse de travail est qu'lip35 serait capable d'assurer les fonctions de la chaîne invariante mais pourrait avoir un rôle distinct et contrôler la présentation antigénique. Pour élucider le rôle d'lip35, nous avons généré un modèle de souris transgéniques exprimant lip35. L'utilisation d'animaux transgéniques nous permet de déterminer l'impact d'lip35 sur l'organisme entier. Il est ainsi possible, non seulement d'analyser les cellules dans des conditions physiologiques, mais aussi de permettre les interactions entre les différentes cellules et organes, ce qui est nécessaire au développement des cellules et de la réponse immunitaire. Les souris C57BL/6 sont une cible de choix pour réaliser nos expériences puisque la majeure partie des études sur li ont été faites sur ces souris, notamment les études utilisant les souris déficientes en chaîne invariante. En faisant l'acquisition de ces souris mliKO très bien caractérisées, on peut alors faire une comparaison directe des résultats de nos souris Tg avec ceux publiés avec les souris mliKO.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'impact de l'isoforme lip35 sur les fonctions d'Ii. Plus précisément nous éluciderons les cinq points suivants :

- L'impact d'lip35 sur la conformation du CMH II, son transport intracellulaire ainsi que son expression en surface.
- Le rôle d'lip35 sur la présentation des lipides par les molécules CD1d et la sélection thymique des cellules T invariantes iNKT.
- Le rôle d'lip35 dans le phénotype et la sélection thymique des cellules T CD4+.
- L'implication d'lip35 dans la maturation des cellules B.
- La fonction d'lip35 dans la présentation antigénique.

La réponse à ces questions permettra de mieux cerner la fonction de l'isoforme lip35 et de déterminer si elle assure les fonctions connues d'Ii et si elle a une fonction particulière et différente. Dans le futur, ceci permettra d'évaluer précisément comment lip35 peut contribuer au développement de certaines pathologies, comme le diabète ou des cancers, et d'éventuellement l'utiliser comme outil pronostic ou cible thérapeutique.

# Chapitre 2. Résultats de l'article n°1

---

## 2.1. Contribution des auteurs

Catherine Ménard a commencé ce projet et a muté, optimisé et cloné lip35 dans le vecteur pDOI6 et l'a testé in vitro. Elle a généré, génotypé et fait la caractérisation préliminaire des premières souris transgéniques. J'ai génotypé et réalisé les croisements de souris ainsi que géré la colonie de souris. J'ai réalisé et analysé toutes les expériences présentées dans cet article et fait les figures. J'ai écrit le papier conjointement avec Jacques Thibodeau. Nathalie Labrecque a apporté l'expertise pour la gestion de la colonie de souris ainsi que pour la réalisation et l'analyse des expériences. Elle a fourni des réactifs essentiels et a révisé l'article. Jacques Thibodeau a planifié le projet et les expériences, analysé les résultats et a revu et corrigé l'article.

## 2.2. The p35 human invariant chain in transgenic mice restores mature B-cells in the absence of endogenous CD74

Laetitia Genève<sup>1</sup>, Catherine Ménard<sup>1</sup>, Nathalie Labrecque<sup>2,3,4</sup> and Jacques Thibodeau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3T1J4, Canada.

<sup>2</sup>Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, H1T2M4, Canada.

<sup>3</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T1J4, Canada.

<sup>4</sup>Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec H3T1J4, Canada

**Correspondence to:** J. Thibodeau, Département de Microbiologie et Immunologie, Pavillon Roger-Gaudry, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit, Montréal, Québec H3T1J4, Canada.

**Status :** published in International Immunology

Received 12 December 2011, accepted 19 April 2012

### 2.3. Abstract

The invariant chain (li; CD74) has pleiotropic functions and li-deficient mice show defects in MHC class II (MHC II) transport and B-cells maturation. In humans, but not in mice, a minor lip35 isoform of unknown function includes an endoplasmic reticulum-retention motif that is masked upon binding of MHC II molecules. To gain further insight into the roles of li in B-cell homeostasis, we generated lip35 transgenic mice (Tgp35) and bred these with mice deficient for li (Tgp35/mliKO). lip35 was shown to compete with mli for the binding to I-A<sup>b</sup>. In addition, classical endosomal degradation products (p20/p10) and the class II-associated invariant chain peptide (CLIP) fragment were detected. Moreover, lip35 favored the formation of compact peptide-MHC II complexes in the Tgp35/mliKO mice. I-A<sup>b</sup> levels were restored at the plasma membrane of mature B-cells but lip35 affected the fine conformation of MHC II molecules as judged by the increased reactivity of the AF6-120.1 antibody in permeabilized cells. However, the human lip35 cannot fully replace the endogenous li. Indeed, most immature B-cells in the bone marrow and spleen of transgenic mice had reduced surface expression of MHC II molecules, demonstrating a dominant-negative effect of lip35 in Tgp35 mice. Interestingly, while maturation to follicular B-cells was normal, lip35 expression appeared to reduce the proportions of marginal zone B-cells. These results emphasize the importance of li in B-cell homeostasis and suggest that lip35 could have regulatory functions.

**Keywords:** invariant chain, Iip35, MHC, antigen presentation, transgenic mouse

## 2.4. Introduction

MHC class II (MHC II) molecules are responsible for exogenous antigen presentation to CD4<sup>+</sup> T-cells. The invariant chain (Ii or CD74) plays a key role in this process. During biosynthesis in the endoplasmic reticulum (ER) of antigen-presenting cells (APCs), three MHC II  $\alpha\beta$  heterodimers combine with a preformed Ii trimer, forming a nonameric complex (1). Acting as a chaperone, Ii assists in the folding of MHC II and prevents ER peptides from gaining access to the groove (2, 3). After ER egress, the di-leucine cytoplasmic motifs of Ii target the nonameric complex to the endocytic pathway (4-6). In more acidic compartments, Ii is degraded sequentially to Iip22 and Iip10, both of which contain a short sequence [class II-associated invariant chain peptide (CLIP)] that blocks the peptide-binding groove (7, 8). Upon the degradation of the p10 fragment by cysteine proteases, CLIP-MHC II complexes are generated (9). While some of these complexes may escape to the plasma membrane, most of the CLIP is released by the non-classical MHC II molecule HLA-DM (H2-DM in mice), which catalyzes the binding of high affinity peptides found in endosomes (10-12). The stable peptide-MHC II complex (pMHC II) is then free to move to the plasma membrane to present nominal antigens to CD4<sup>+</sup> T-cells (13).

Early studies performed on Ii-null mice have highlighted the role of the chaperone in MHC II folding, trafficking, and antigenic presentation. These mice showed aggregation and aberrant transport of MHC II molecules, which resulted in decreased cell surface expression (14-16). Additionally, instead of taking on the compact conformation typically seen in stable  $\alpha\beta$  heterodimers associated with antigenic peptides, most MHC II molecules

remained in a floppy state (17, 18). These maturation perturbations had profound consequences on thymic selection. Indeed, the CD4<sup>+</sup> compartment in Ii-deficient mice was found to be affected in terms of both absolute T-cell numbers and repertoire diversity (19, 20). Interestingly, the critical role of Ii in MHC II folding was shown to be allele-specific, I-A<sup>b</sup> being greatly affected in Ii-null mice (14, 21).

In addition to its impact on T-cell development, Ii expression has been shown to affect B lymphocyte homeostasis. Indeed, except for NOD mice, Ii-deficiency in all tested mouse backgrounds resulted in reduced numbers of mature follicular (FO) B-cells in secondary lymphoid organs (22, 23). Although this phenotype was attributed to a defect in B-cell maturation, it was recently suggested that FO cells have a shorter life span in the absence of Ii (24). The molecular mechanism underlying this Ii effect remains controversial. While some have suggested that Ii is required to transduce signals and activate nuclear factor (NF)-κB (25), others have reported that it plays a role in preventing the toxic accumulation of free β chains or weakly associated MHC II heterodimers in the ER of B-cells (24, 26, 27).

Several new functions have recently been attributed to Ii, some of which are not directly related to peptide loading. For instance, Ii's folding and/or trafficking properties do not appear to be exclusive to classical MHC II molecules, and would also benefit MHC I, the neonatal Fc receptor, CD1, and CD70 (28-31). As mentioned above, Ii has the ability to transduce signals following cleavage of its transmembrane domain and release of its cytoplasmic tail (25). In addition, at the cell surface, Ii serves as the receptor for both the macrophage migration inhibitory factor (MIF) and *Helicobacter pylori* (32, 33). More recently, Ii has been shown to interact with myosin to negatively regulate dendritic cells (DCs) motility *in vivo* (34). The most recent studies have been performed in mice and the results suggest that Ii strongly impacts the control of immune responses.

In mice, alternative splicing of exon 6 in Ii mRNA leads to the translation of two isoforms of 31kDa (Iip31) and 41 kDa (Iip41), respectively (35). The additional domain in

lip41 serves as a chaperone for various cathepsins in the endocytic pathway (36). In humans, the use of two different start codons on each mRNA allows the production of a total of four isoforms termed lip33, lip35, lip41, and lip43, the last two comprising the cathepsin binding domain (37). The lip33 and lip35 isoforms are predominant, lip33 being about four times more abundant than lip35 (1, 38, 39). A type II protein, the lip35 isoform bears a 16-amino acid N-terminal cytoplasmic extension. This region contains an Arg-x-Arg (RxR) ER retention motif which is inactivated upon phosphorylation of two adjacent serines and association of MHC II molecules (39-44). Unlike lip33, lip35 is rapidly internalized, preventing any accumulation at the plasma membrane (45, 46). lip35/p43 isoforms are dominant and dictate the fate of mixed Ii trimers (38, 40).

While the physiological role of Ii's RxR motif is unknown, some studies have determined that the deregulation of the lip33/lip35 ratio impacts peptide loading, ER exit rate and compartment localization. Newcomb and Cresswell (41) tracked proteolytic intermediates to show that lip33 and lip35 are differentially transported to endosomes and vary in their capacity to support peptide loading. In addition, Anderson and Roche (43) demonstrated that lip35 phosphorylation increases both its degradation and MHC II peptide loading, suggesting a possible post-translational regulation of antigen presentation.

Ii-null C57BL/6 mice present defects in I-A<sup>b</sup> folding and trafficking that lead to reduced antigen presentation. To further investigate the biology of Ii and its role in B-cell homeostasis, we generated transgenic mice expressing exclusively the human lip35 isoform on both murine Ii-proficient and -deficient backgrounds.

## 2.5. Methods

### Generation of Tg mice

The li cDNA encoding exclusively the lip35 isoform was generated by mutating the second methionine to an alanine (42). This cDNA was optimized at the Kozak sequence, cloned under the control of the murine li gene promoter in the pDOI6 vector, linearized and injected into FvB mice embryos (47). Offspring were genotyped for the presence of lip35 by PCR using the following primers: 5'-GAAACTGACAGTCACCTC-3' and 5'-GAAGTCAGATGCTCAAGG-3'. Three different founders (Tgp35) were obtained and bred with C57BL/6 mice for 20 generations. To obtain the transgenic lip35 mice devoid of murine li (Tgp35/mliKO), Tgp35 mice were bred with C57BL/6-mliKO mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) for 20 generations. The mli gene was genotyped by PCR as described previously (27). All experiments were performed in accordance with the Canadian Council of Animal Care.

### Antibodies and peptide

BU45 and Pin-1 mouse hybridomas produce IgG<sub>1</sub> mAbs that specifically recognize the C- and N-terminal parts of human li, respectively (38, 48). They were purified from cell culture supernatants and coupled to Alexa-647 (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Likewise, In-1, a rat IgG<sub>2b</sub> mAb specific for the N-terminal part of murine li (BD-Pharmingen, Mississauga, Canada), was coupled to Alexa-647. The D-6 mAb (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa-Cruz, CA, USA) recognizes the C-terminal part of human and mouse li. The M5/114 antibody which recognizes the I-A<sup>b</sup> $\beta$  chain was purified from cell culture supernatants, while the 30-2-FITC mAb specific for the CLIP/I-A<sup>b</sup> complex was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. CD11c-biotin, IgM-PercP, IgD-FITC, and CD21-PE antibodies were purchased from BD Pharmingen. The  $\alpha$ -IgM-PE,  $\alpha$ -B220-FITC, and  $\alpha$ -I-A<sup>b</sup> $\beta$  (28-16-8S; mouse IgM) antibodies were purchased from Invitrogen. Antibodies against I-

$A^b\beta$  (AF6-120.1), IgD-PercP, CD19-PE, and CD19-Alexa647 were purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA), while the  $\alpha$ -actin was obtained from Calbiochem (Mississauga, Canada). The rat anti-mouse H2-DM (2C3A) was a kind gift from Dr L. Karlsson. The mouse anti-I-A $b$  KL295 hybridoma was purchased from ATCC and antibodies were purified from cells culture supernatant.

Secondary reagents, including streptavidine-PE, goat anti-mouse IgG peroxidase, and goat anti-rat peroxidase, were purchased from Jackson ImmunoResearch, Inc. (West Grove, PA, USA), while the donkey anti-rat-APC and the anti-mouse Ig True blot were obtained from eBioscience (San Diego, CA, USA). The biotinylated CLIP peptide (81 to 105 segment of Ii) was purchased from Elim Biopharmaceuticals Inc. (Hayward, CA, USA).

### **Flow cytometry**

Spleen and bone marrow (BM) were dissociated to obtain single cell suspensions. Red blood cells were lysed by incubating them for 5 min in 0.83% NH<sub>4</sub>Cl. Cells ( $10^6$ ) were resuspended in PBS, FBS 3% and HEPES 10 mM and stained for 30 min on ice. For total staining, cells were permeabilized for 10 min in the same buffer containing 0.1% saponin. Cells were analyzed on a FACSCalibur® flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, Canada).

### **Western blot analysis**

Splenocytes were collected by centrifugation resuspended in lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1% Chaps or 1% Triton), kept on ice for 30 min, and then pelleted to eliminate nuclei and debris. Protein extracts were mixed with reducing Laemmli buffer (2% SDS), boiled for 5 min, and resolved by SDS-PAGE (12%), unless mentioned otherwise.

After transfer, membranes were incubated overnight with specified mAbs and revealed with the appropriate HRP-coupled secondary Ab.

For immunoprecipitations, mAbs or isotypic controls were coupled to sepharose beads (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) in lysis buffer for 1 h at 4°C and washed three times. Cell lysates were then incubated with Ab-coupled beads in lysis buffer overnight at 4°C. After three washes, beads were resuspended in Laemmli buffer and boiled for 5 min, unless mentioned otherwise. Proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed on immunoblots.

### **Splenic DC isolation**

Isolated spleens were digested using 0.1% collagenase D and 20 µg.mL<sup>-1</sup> DNase for 45 min at 37°C. Cell suspensions were filtered on a 70 µm nylon filter (BD Falcon<sup>TM</sup>) and washed in PBS, 0.5% BSA, and 2 mM EDTA. Harvested cells were then added on a 14.7% nycodenz solution (Sigma, Oakville, Canada), centrifuged for 20 min at 1200 x g and washed twice in complete media.

### **BM-derived DCs**

BM-derived DCs (BMDCs) were generated as described previously (49). Briefly, BM cells were cultivated for 7 days with GM-CSF 500 U.mL<sup>-1</sup> (Invitrogen) and IL-4 (~ 250U/mL), originating from P815-IL-4 hybridoma supernatant.

## **2.6. Results**

### **Generation of transgenic lip35 mice**

The lip35 cDNA was obtained by mutating the second methionine-encoding triplet (42). This prevents internal translation initiation and production of the lip33 isoform. The

cDNA was cloned under the control of the murine li gene promoter in the pDOI6 vector and injected in mice embryos (47). We obtained three different founders which were bred with C57BL/6 to obtain Tgp35 mice. In addition, mice were bred with li-null C57/BL6 mice to generate animals that only express the human lip35 (Tgp35/mliKO). Most experiments were performed on the offspring of all founders and generated the same results. As expected, using the human li-specific Pin-1 mAb, western blotting revealed that lip35 was expressed in both Tgp35 and Tgp35/mliKO mice splenocytes (Supplementary Figure S1).

### **Expression of lip35 in APCs**

The pattern of lip35 protein expression in Tg mice was assessed by flow cytometry in different cell types. As seen in Fig. 2-1, lip35 was found in APCs, but its expression was heterogeneous. Moreover, as opposed to the endogenous mli, only a fraction of cells in any given APC population expressed lip35. Indeed, ~ 33% of splenic B-cells, ~ 47% of splenic DCs and ~ 24% of BMDCs were positive for lip35 (Fig. 2-1A-D). Interestingly, the endogenous mli was more abundant in the Tgp35 B-cells compared with wild-type (Fig. 2-1B, right panel) and this difference was significant (Fig. 2-1C, left panel). The analysis was also performed on cells double-stained for mli and lip35. The results confirmed the significant increase of mli in lip35<sup>+</sup> versus lip35<sup>-</sup> cells (Fig. 2-1C, right panel), suggesting that lip35 and mli compete for binding to MHC II molecules. While it has yet to be determined why the overall pattern of lip35 expression does not match that of the endogenous li, it remains that all three founders showed the same phenotype (data not shown).

### **Interaction of lip35 with murine li and MHC II molecules**

The human li has previously been shown to bind murine MHC II molecules (50). Likewise, I-A<sup>b</sup> co-immunoprecipitated lip35 from lysates of Tgp35 and Tgp35/mliKO splenocytes (Fig. 2-2A). lip35 was also co-immunoprecipitated with the endogenous mli in Tgp35 cells (Fig. 2-2A). Accordingly, mli was co-immunoprecipitated with I-A<sup>b</sup> and lip35 (hli) in Tgp35 cells (Fig. 2-2B). Ig light chains of antibodies used for immunoprecipitations were all recognized by the anti-rat secondary antibody used for blotting and are identified by a bracket.

We then asked if the presence of mli in Tgp35 mice could affect lip35 expression compared with Tgp35/mliKO mice. As seen in Fig. 2-2C, CD19<sup>+</sup> splenocytes from both Tg mice expressed similar levels of lip35, based on the staining with BU45, a mAb which recognizes the C-terminal end of unprocessed hli. However, almost twice as many cells expressed lip35 in the Tgp35/mliKO mice compared with Tgp35 mice (51% versus 27%, respectively).

Next, we investigated whether lip35 could egress the ER and be processed to low molecular weight intermediates. For these experiments, we used the highly sensitive D-6 mAb. lip35 was immunoprecipitated from Tgp35/mliKO cells and analyzed on immunoblots (Fig. 2-2D). Two fragments of 22 kDa (p22) and 10 kDa (p10) were detected, a pattern consistent with the degradation of lip35 by pH-sensitive cysteine proteases in the endocytic pathway (2, 3). These results indicate that the initial steps in lip35 maturation are normal and that the RxR retention motif can be masked by I-A<sup>b</sup>, allowing ER egress and trafficking to degradative endocytic compartments.

The pattern of lip35 degradation fragments suggests that p10 would eventually be cleaved by cathepsins in endosomes to generate CLIP. To test this, we used the 30-2 mAb raised against the human CLIP-I-A<sup>b</sup> complex (51). Although this mAb can cross-react with I-A<sup>b</sup> associated with the mouse CLIP on LPS-activated wild-type blasts (51), its reactivity is weak; no signal was detected in C57BL/6 mice under our experimental conditions (Fig. 2-

2E). However, Tg cells accumulated intracellularly some 30-2 complexes, while stainings were negative at the plasma membrane (data not shown). The levels of CLIP/I-A complexes were monitored specifically in *lip35<sup>+</sup>* cells stained for CD19, BU45 and 30-2 Abs (Fig. 2-2F). The fact that *lip35<sup>+</sup>* spleen cells from the Tgp35/mliKO display significantly more CLIP/MHC II complexes than the Tgp35 cells suggested again that the human and mouse li compete for binding to I-A<sup>b</sup>.

An important player in the release of CLIP from MHC II molecules is H2-DM. It has been suggested that mli serves as a chaperone for H2-DM since its expression is reduced in li-deficient animals (23, 52). We assessed the levels of H2-DM in our Tg mice (Supplementary Figure S2). As expected, splenocytes from li-null mice accumulated less H2-DM than wild-type mice. Interestingly, Tgp35/mliKO cells did not up-regulate H2-DM, while levels in Tgp35 and wild-type mice were comparable. These results suggest that the accumulation of CLIP may be due to the reduced interaction between H2-DM and human li.

### ***lip35 generates compact MHC II molecules***

Previous reports have shown that most I-A<sup>b</sup> $\beta$  chains in li-null mice remain in an immature state and migrate faster on SDS-PAGE (14-16,23). These immature products correspond to non-terminally glycosylated chains that have not gained access to the golgi and are sensitive to endoglycosidase H ((14) and data not shown). Given that *lip35* interacts with I-A<sup>b</sup> in the presence or absence of murine li, we tested its impact on the fine conformation of MHC II molecules. Splenocytes were lysed and analyzed on immunoblots under denaturing conditions. As for the mliKO cells, the major  $\beta$  chain pool in the Tgp35/mliKO cells was constituted of the faster migrating immature (labeled  $\beta'$ ) species

(Fig. 2-3A). Interestingly, in Tgp35 cells, expression of lip35 caused the accumulation of some immature  $\beta'$  chains despite the presence of the endogenous mli.

Next, we addressed the effect of lip35 on the generation of compact I-A<sup>b</sup>-peptide complexes. Splenocytes were lysed and analyzed on immunoblots under non-reducing and non-boiled conditions using the conformation-dependent M5/114 mAb, which recognizes primarily I-A<sup>b</sup>  $\alpha\beta$  heterodimers. Several studies have shown that in the absence of li, especially in B6 mice, MHC II molecules can adopt a ‘floppy’ conformation, reflecting either an empty groove or loosely associated peptides (21,53,54). In addition, most I-A<sup>b</sup> molecules are misfolded and do not traffic properly to the cell surface, which in turn hinders antigenic presentation (14-16). As expected, in wild-type mice, all peptide/MHC II complexes were in a compact state (labeled ‘C’) of ~55 kDa under non-boiled conditions (NB) (Fig. 2-3B). These complexes readily dissociated upon boiling (B). The M5/114 mAb is primarily a conformer and usually does not detect the isolated 29 kDa  $\beta$  chain. As described previously, the few I-A<sup>b</sup> molecules that folded in li-deficient B6 mice adopted a floppy conformation (‘F’) and migrated slightly slower to ~65 kDa (14, 15). Moreover, a high molecular weight band, corresponding to aggregated MHC II products that form in the ER in the absence of mli (16), could be seen at the top of the gel (Fig. 2-3B, open arrow). To determine the impact of lip35 on the fine conformation of I-A<sup>b</sup>, spleen cells were sorted with the D-6 mAb, which recognizes the C-terminus of li. Surprisingly, the non-boiled samples from Tgp35 cells also showed a high molecular weight band (but no floppy forms), suggesting that I-A<sup>b</sup> molecules that fold in the absence of li or in the presence of lip35 can form aggregates (Fig. 2-3C). These most likely correspond to the  $\beta'$  chains observed under denaturing conditions (Fig. 2-3A). Interestingly, samples from the Tgp35/mliKO showed principally the presence of compact forms. The band is weak, probably due to the low expression of lip35 in many cells (see Fig. 2-2C). Still, there was no floppy heterodimers in these conditions. Upon boiling, the compact forms were lost. Although M5/114 is principally a conformer, it has been shown to detect reduced and

denatured I-A<sup>b</sup>β chains on western blots (23). Interestingly, M5/114 somewhat recognized the isolated 29 kDa β chain in our non-reduced samples from the Tgp35 lysates, raising the possibility that a fraction of the molecules are improperly oxidized in the presence of lip35. Altogether, these results show that lip35 promotes the formation of compact complexes but generates also high-molecular weight aggregates.

### **lip35 affects the loading of exogenous peptides**

While previous studies have shown that Ii-null cells display less MHC II molecules, their floppy or SDS-sensitive conformation allows for better binding of exogenous synthetic peptides (14-16). Given the lip35-mediated increase in compact MHC II I-A<sup>b</sup> heterodimers in Tgp35/mliKO mice, we asked whether the loading of exogenous peptides could be affected. We used the synthetic human CLIP peptide which forms a strong complex with I-A<sup>b</sup> (55, 56). Purified spleen cells were incubated with the biotinylated synthetic peptide before permeabilization and incubation with the lip35-specific mAb. Our results confirmed that Ii-deficient cells had strong peptide binding abilities (Fig. 2-3D). In Tgp35/mliKO cells, high lip35 expression strongly decreased the binding of the exogenous peptides. No effect of lip35 was observed in Tgp35 cells that already bind little exogenous peptides. Together, these results confirm the effect of lip35 on the fine conformation of I-A<sup>b</sup>.

### **lip35 increases MHC II surface expression**

In Tgp35/mliKO cells, lip35 expression increased levels of MHC II compact forms, which were detected on immunoblots (Fig. 2-3C). Using flow cytometry, we next assessed the effect of lip35 on I-A<sup>b</sup> cell surface expression. As expected, I-A<sup>b</sup> expression was reduced at the plasma membrane of mliKO mice (MFV=8.7) compared with wild-type mice

(MFV = 26.2) (Fig. 2-4A and B). In C57BL/6 mice, lip35 expression did not affect I-A<sup>b</sup> levels. Interestingly, in li-null mice (Tgp35/mliKO) spleen cells, lip35 expression significantly increased surface expression of MHC II molecules (MFV=15.1). Such an intermediate expression of MHC II molecules reflects, at least in part, the fact that only about one third of CD19<sup>+</sup> cells express lip35 (Fig. 2-1B; data not shown).

We performed three-color flow cytometry to better evaluate the effect of lip35 in B-cells. Isolated spleen cells were stained for CD19 and MHC II molecules, permeabilized and stained for lip35 using BU45. While MHC II levels were low at the surface of li-deficient B-cells, the expression of lip35 restored normal levels in a dose-dependent manner (Fig. 2-4C, right panel). While a defined population of cells (circled) expressing high levels of lip35 and low levels of I-A<sup>b</sup> was apparent, these results still confirm that lip35 is functional in assisting the folding and trafficking of I-A<sup>b</sup> in a fraction of mouse B-cells.

#### **The absence of mli alters the conformation of I-A<sup>b</sup>**

Although we have shown that lip35 can restore I-A<sup>b</sup> surface expression, the possibility remains that it also causes the intracellular accumulation of MHC II molecules. This was first tested by flow cytometry. Splenocytes were permeabilized and stained with the AF6-120.1 mAb specific for a conformational epitope on I-A<sup>b</sup>β (57). Surprisingly, we found significantly less MHC II molecules in wild-type mice (MFV=17) than in their li-deficient counterparts (MFV=41.2) (Fig. 2-5A and B). To our knowledge, such a dramatic phenotype has not been reported before on the H-2<sup>b</sup> background (23). Other I-A-specific mAbs, including M5/114, originally used to demonstrate reduced MHC II molecules in li-deficient mice, were also tested (14, 15). While the results confirmed that I-A<sup>b</sup> levels in li-null mice were reduced, both at the plasma membrane and in intracellular compartments (Fig. 2-5C-F), they emphasized the peculiar phenotype revealed by the AF6-120.1 mAb.

Interestingly, the presence of lip35 exacerbated this phenotype as the Tgp35/mliKO cells (MFV=95) are more reactive to this mAb than mliKO (MFV=41.2) (Fig. 2-5A and B). Importantly, the expression of lip35 in mli<sup>+</sup> cells (Tgp35) also increased the staining of AF6-120.1. To confirm that the increased reactivity of this mAb in transgenic mice was caused by lip35, mature IgD<sup>high</sup> splenocytes were analyzed with AF6-120.1 before (surface) or after (total) permeabilization (Fig. 2-6). Compared with wild-type, splenocytes from li-deficient animals demonstrated little reactivity with AF6-120.1 at the cell surface (Fig. 2-6A). Most of the AF6-120.1<sup>+</sup> material was detected only after permeabilization (Fig. 2-6B). Even though lip35 expression restored I-A<sup>b</sup> surface levels in a dose-dependent manner in Tgp35/mliKO cells, upon permeabilization, these cells showed impressive amounts of AF6-120.1-reactive  $\beta$  chains compared with wild-type or mli-deficient cells. lip35-expressing Tgp35 cells also showed a strong intracellular accumulation of MHC II products in the presence of mli.

The increased AF6-120.1 reactivity could be due either to an accumulation of I-A<sup>b</sup>-related products, to a serological modification in the absence of mli, or to the cross-reactivity of the mAb against an unknown antigen uncovered in mli-negative cells. To help distinguish between these possibilities, immunoprecipitations using AF6-120.1 were performed using spleen cells from wild-type, mliKO and Tgp35/mliKO mice, these last two exhibiting the strongest reactivity to this mAb. The samples were blotted with the KL295 mAb, which recognizes the denatured I-A<sup>b</sup> $\beta$  chain. Approximately, a 28-kDa band was detected in all cell lysates and was immunoprecipitated principally from the mliKO and Tgp35/mliKO cells, in line with the strong AF6-120.1 staining in these mice (Fig. 2-6C). No other band of lower molecular weight was observed, showing that the AF6-120.1-reactive material includes an intact I-A<sup>b</sup> $\beta$  chain. Of note, the total amount of  $\beta$  chain detected by KL295 in the different cell lysates is very similar, showing that the knock-out and transgenic mice do not accumulate more of I-A<sup>b</sup>. Altogether, these results suggest that the

conformational AF6-120.1 epitope on I-A<sup>b</sup>β chain is restricted to a subset of molecules and that it can be down-modulated by mli. On the other hand, the expression of lip35 appears to favor the conversion of I-A<sup>b</sup> molecules to the AF6-120.1<sup>+</sup> conformation.

### **lip35 is expressed in immature BM B-cells**

In mice, li was shown to have a strong impact on B-cell homeostasis, as evidenced by the reduced survival of mature cells in the spleen of li-null animals (22). As li and MHC II do not appear to be required for B-cell maturation (27), we hypothesized that expression of lip35 in the BM progenitors would not affect B-cell development. BM cells were isolated, permeabilized, and stained for B220 and li. In Tgp35 mice, more cells (63%) expressed the lip35 transgene compared with endogenous mli (44%) (Fig. 2-7A). This suggests that the pDOI-6 promoter which regulates lip35 may be turned on at an earlier stage of differentiation. Similar results were obtained in Tgp35/mliKO mice (data not shown). Interestingly, as observed in splenocytes (Fig. 2-1B and C), the amount of endogenous mli (MFV = 88 in the wild-type) increased in Tgp35 (MFV = 194), suggesting again that mli is retained in the ER and not efficiently processed due to the presence of the competing lip35. It should be noted that a small population of B220<sup>+</sup>, I-A<sup>b+</sup> cells were negative for BU45 (Fig. 2-7B, right panel). These cells most likely express mli, given that all I-A<sup>+</sup> cells in the BM are mli<sup>+</sup> (data not shown).

We also measured the impact of lip35 on I-A<sup>b</sup> cell surface expression. The I-A<sup>b</sup> profile gated on B220<sup>+</sup> li<sup>+</sup> cells is seen in Fig. 2-7C. While mli<sup>+</sup> cells expressed I-A<sup>b</sup> in wild-type mice (MFV = 101), the presence of lip35 in Tgp35 cells caused a marked reduction in the amount of I-A<sup>b</sup> displayed at the plasma membrane (MFV = 27). These results demonstrate that lip35 acts as dominant-negative and cannot replace the endogenous murine lip31.

**T1 cells *hli*<sup>high</sup> do not up-regulate MHC II levels**

Based on the aberrant phenotype of BM B-cells observed in Tgp35 mice, we asked if *lip35* could allow proper migration and maturation of B-cells in secondary lymphoid organs. In wild-type and Tgp35 animals, ~95% of immature CD21<sup>low</sup> IgD<sup>low</sup> cells (T1) expressed the endogenous *mli* (data not shown). We evaluated the expression of *lip35* in T1 cells with four-color flow cytometry using mAbs specific for CD21, IgD, I-A<sup>b</sup>, and *li* (Fig. 2-8A). *lip35* was expressed in 79.9 and 61.6% of T1 B-cells in Tgp35/*mliKO* and Tgp35 mice, respectively. As seen in the BM and total splenocytes, high levels of *lip35* did not appear to entirely restore I-A<sup>b</sup> expression at the plasma membrane. Thus, we analyzed the impact of *lip35* on BU45<sup>neg</sup>, BU45<sup>int</sup>, and BU45<sup>high</sup> T1 cells (Fig. 2-8B and C). In both Tg mice, the BU45<sup>high</sup> cells expressed less surface I-A<sup>b</sup>, defining a sub-population of cells that most likely do not fully support ER egress of *lip35*. These BU45<sup>high</sup> cells are reminiscent of the peculiar population seen in Fig. 2-4 (circled). Together, these results show that most T1 cells in the spleen express high levels of *lip35*, but do not up-regulate MHC II at the cell surface.

We then asked whether the proportions of T1 B-cells were normal in Tg mice. Based on IgD and CD21 expression, the presence of *lip35* did not affect the overall distribution of different B-cell subsets, either on the wild-type or on the *li*-null backgrounds (data not shown). However, given the low percentages of *lip35*<sup>+</sup> cells and the heterogeneous protein expression levels (Fig. 2-1B), we analyzed the data in the context of the level of BU45 staining. It has been reported that in the spleen, the percentage of T1 cells increases in the absence of *li*, most likely due to the reduction of the FO compartment (22, 23). In absolute numbers, all mice appeared to have similar T1 compartments (data not shown) and our data corroborates the increased percentage of T1 cells in *mli*-null mice (Fig. 2-9A). The proportion of T1 cells increased from 11.2% in wild-type cells to 23.8% in *mliKO* cells and this difference was statistically significant (Fig.

2-9D) However, BU45<sup>high</sup> cells were significantly enriched in the T1 population of Tg animals and accounted for about 50% of CD19<sup>+</sup>hli<sup>high</sup> splenocytes (Fig. 2-9B and D). These proportions are much higher than those observed in mliKO mice, suggesting that these T1 Tg cells do not mature properly.

In the hli<sup>int</sup> cell population of Tgp35/mliKO, the number of T1 cells was found to be similar to wild-type (Fig. 2-9C and E). Although T1 numbers in the Tgp35 (18.7%) were not as low as those in the wild-type (11.2%), they were clearly and statistically lower than those seen in mliKO (23.8%). Altogether, these results suggest that lip35 restores the maturation/survival of a high proportion of splenic B-cells.

### **lip35 restores the mature B-cell compartment**

In the absence of li, mice display a perturbed mature B-cell compartment. Despite normal precursor numbers in li<sup>-/-</sup> mice, studies have shown that the number of mature B-cells in the spleen is greatly reduced (22-24). Our data demonstrated that up to the T1 stage, although MHC II levels were not fully restored, a large fraction of B-cells continued to express lip35. We next tested if the lip35<sup>+</sup> T1 cells could develop into FO cells. Analyses were performed on both lip35<sup>int</sup> and lip35<sup>high</sup> cells. Although the bulk of BU45<sup>high</sup> cells could be seen in the T1 subset, some were also found in other sub-populations. As seen in Fig. 2-9A, ~80% of wild-type mice cells had matured through the T2-FO stages. In contrast, this population was markedly reduced (47%) in li-null mice (Fig. 2-9A and D). The hli<sup>high</sup> cells from Tg mice show the same proportions of these mature cells as the mliKO, suggesting that fewer cells expressing high levels of lip35 acquire a mature phenotype. Alternatively, these cells may mature, but may not receive appropriate survival signals. Interestingly, as others have reported, we found that mliKO mice have a more important marginal zone (MZ) compartment (24). However, although the Tg hli<sup>high</sup> cells had a smaller percentage of mature FO cells, there was no concomitant increase in the MZ population

(Fig. 2-9B and D). In fact, there were even less MZ cells in Tg mice compared with wild-type. These results demonstrate that MZ and FO B-cell defects in mliKO mice are independent and can be dissociated. Different mechanisms have recently been proposed to control these phenotypes (24).

When the proportions of mature B-cells were analyzed in the context of hli<sup>int</sup> cells, high proportions of FO cells were found in Tg mice (Fig. 2-9C and E). These B-cells accounted for ~80% of CD19<sup>+</sup>hli<sup>int</sup> splenocytes in Tg animals, a proportion similar to that observed in wild-type mice. A four-color flow cytometry analysis using CD19, IgD, IgM and hli markers confirmed that lip35 restores the compartment of mature FO B-cells (Supplementary Figure S3). However, the proportion of MZ cells was reduced in the context of lip35 expression (Fig. 2-9C-E). In accordance with the slightly higher proportion of hli<sup>int</sup> T1 cells in Tgp35 (Fig. 2-9C and E), our results suggest that cells expressing both mouse and human li chains mature less efficiently.

## 2.7. Discussion

The biology of li is complex. This chaperone appears to intervene in processes as diverse as antigen presentation, signal transduction and cell motility. In humans, the benefits conferred by the expression of lip35 remain to be discovered. It is remarkable that such a short 16-amino acid extension at the N-terminal of li has the potential of adding multiple layers of complexity in the regulation of antigen presentation. Indeed, lip35 is particular as it encompasses phosphorylation sites, an ER retention motif and 14-3-3 binding sites. Moreover, lip35 is dominant and dictates the intracellular trafficking behavior of lip33 and lip41 isoforms in mixed trimers. We have expressed this lip35 isoform in mice in order to perturb the function of the endogenous mli and get new insights into the function of these chaperones.

The Tgp35 mice were crossed onto the li-null background to obtain a Tgp35/mliKO line with lip35 representing the sole chaperone for I-A<sup>b</sup>. Of note, Honey *et al.* (55) have previously reported that the human li was functional in mli-proficient and -deficient mice. However, they used a genomic DNA fragment to generate Tg animals, which resulted in the predominant expression of lip33. Although not fully characterized, these mice did not show any aberrant phenotype, even when crossed on a mli-null background. This suggests that the human lip33 and the mouse lip31 are interchangeable.

As one of the most important roles of li is the chaperoning of MHC II molecules, we first characterized biochemically the interaction of lip35 with I-A<sup>b</sup>. The fact that specific endosomal degradation products such as p10 were detected on immunoblots confirms that some of the lip35 molecules are efficiently chaperoning I-A<sup>b</sup>. CLIP/I-A<sup>b</sup> complexes were also detected in permeabilized cells but not at the plasma membrane, indicating that they must have encountered H2-DM along the endocytic pathway (Fig. 2-2).

Li-deficient cells show a defect in the association of newly synthesized I-A<sup>b</sup> α and β chains, which resulted in reduced M5/114 staining of permeabilized cells (14, 21, 23). The presence of lip35 in Tgp35/mliKO cells favored the association of α and β chains based on intracellular M5/114 staining (data not shown) as well as the formation of compact forms of I-A<sup>b</sup> to the detriment of floppy heterodimers (Fig. 2-3C). Interestingly, the presence of lip35 in Tgp35 cells expressing the endogenous mli caused the accumulation of some immature I-A<sup>b</sup> molecules and the apparition of aggregates (Fig. 2-3A and C). Although this had no significant impact on the overall cell surface display of MHC II molecules, it is reminiscent of the situation in li-deficient mice and suggests that some I-A molecules are trapped by those lip35 chains that do not egress the ER. In Tgp35 cells, as judged by the strong increase in AF6-120.1 mAb reactivity, there is clearly a large body of MHC II molecules that bind lip35.

It is intriguing that lip35 exacerbates the phenotype of li-deficient cells regarding the reactivity of the AF6-120.1 mAb. Although li-deficiency on the I-A<sup>k</sup> background caused

the overt accumulation of MHC II, this is not the case for I-A<sup>b</sup>. Indeed, western blot and flow cytometry experiments using conformation-independent antibodies showed no increase in the levels of I-A<sup>b</sup> α and β chains in li-negative spleen cells (23) (Fig. 2-6C). Together, these results demonstrate that the effect of lip35 on the recognition of intracellular MHC II molecules by the AF6-120.1 mAb is conformational. Of note, the increase in I-A<sup>b</sup> expression at the surface of mature lip35<sup>+</sup> B-cells in mli-deficient animals (Fig. 2-4C) is not the mere reflection of the increased overall pool of AF6-120.1<sup>+</sup> molecules since it was also observed with the 28-16-8S and M5/114 mAbs (data not shown).

The fact that lip35 expression reduces the loading of exogenously supplied peptides in the absence of mli is in line with a conformation change of I-A<sup>b</sup>. It is puzzling that the cells which were clearly affected are those T1 immature cells that express the most lip35 but which do not strongly up-regulate surface I-A<sup>b</sup>. When compared with mliKO cells that express similar amounts of surface I-A<sup>b</sup>, the proportion of MHC II molecules that make it to the plasma membrane in those T1 cells have clearly a different conformation. Still, the cells expressing intermediate levels of lip35 do not bind more exogenous peptides but since they express more I-A<sup>b</sup> at the surface, we conclude that the pool of MHC II molecules reaching the plasma membrane are compact and refractory to peptide exchange.

Our results demonstrate that lip35 can egress the ER to restore MHC II levels in some B-cells. In this context, it was interesting to determine the impact of lip35 on B-cell homeostasis. In the BM, more B220<sup>+</sup> cells express lip35 compared with the endogenous mli (Fig. 2-7). These lip35<sup>+</sup> cells showed a marked reduction in expression of surface I-A<sup>b</sup>, even in Tgp35 cells in which mli is also expressed. The reasons for this dominant-negative effect remain to be investigated, but a likely explanation is that lip35 is not phosphorylated in these cells, causing the ER retention of all associated molecules. Such a

scenario would explain the increased expression of mli as its ER retention would prevent degradation in endosomes.

Matza *et al.* (25) have clearly demonstrated that li-driven signaling is critical for the establishment of a normal mature B-cell compartment in the spleen. Interestingly, NF- $\kappa$ B activation necessitates regulated intramembrane proteolysis in the endocytic pathway and the release of the N-terminal 42-amino acid li region. In support of this model, transgenic mice expressing only the short 1-82 N-terminal region of li (apparently devoid of any chaperoning activity toward MHC II) had a normal B-cell compartment (58). Thus, it appears that MIF binding is not a prerequisite for NF- $\kappa$ B activation by li. We do not know if lip35 does bind MIF, but we propose that it undergoes proteolysis in endosomes and initiates signaling events. However, many BM and T1 cells in Tg mice appear to express high levels of lip35 without a concomitant increase in I-A<sup>b</sup> surface expression. This indicates that lip35 is not processed in all cells and accumulates presumably in the ER where it cannot signal. It will be interesting to determine if we can modulate ER egress of lip35 in these T1 cells, allowing their maturation into FO cells. If this cell population represents a specific subset of T1 cells remains to be established.

Our transgenic mice will be useful in the future to refine the mechanisms involved in B-cell maturation and survival. Also, we will deepen the characterization of the I-A<sup>b</sup> fine structure in lip35<sup>+</sup> cells and the associated peptide repertoire in the context of thymic selection of CD4<sup>+</sup> T cells. The capacity of lip35 to chaperone other ligands such as CD1d will be investigated as well.

Upheaval of the MHC II pathway in mice by the introduction of hlip35 allowed us to shed new light on the biology of li. Some of the effects observed here cannot be formally ascribed to the peculiar structure of lip35. For example, the inability of lip35 to rescue H2-DM expression may be a characteristic of all human li isoforms and a thorough characterization of Tg mice expressing mainly lip33 will be needed to resolve such issues (55). On the other hand, the incapacity of lip35 to rescue I-A<sup>b</sup> surface expression in

immature B-cells is clearly due to specific structural characteristics of lip35. Indeed, mli-deficient Tg mice expressing preferentially hlip33 did not show any defect in MHC II surface expression and the fine conformation of their I-A<sup>b</sup> molecules appeared normal based on their reduced capacity to bind synthetic peptides compared with mli-deficient animals (55). Future studies should address the role of lip35 on the fine structure of MHC II molecules in defined B-cell subsets and in other cell types as well. In addition, other MHC II alleles should be tested by crossing our mice on different H-2 backgrounds. For example, even in the presence of li, alleles such as I-A<sup>d</sup> appear to preferentially fold as SDS-unstable dimers rather than compact or floppy forms (21).

In conclusion, it is tempting to speculate that B-cell homeostasis in humans could be regulated through the modulation of lip35 ER egress. Given the importance of PKCs in the activation of B-cells, in autoimmunity, and in the phosphorylation of lip35, a complex interplay of factors including li may operate in various B-cell pathologies (39, 59, 60).

## 2.8. Funding

National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (grant number 298537).

## 2.9. Acknowledgements

We would like to thank Dr Hayssam Khalil for helpful discussions and Serge Sénechal for helping with flow cytometry. Special thanks to Marie-Pierre Hardy and Julie Leboeuf for helping with the isolation and analysis of splenocytes. We are grateful to L. Karlsson, R. Lindner, O. Bakke, A. Rudensky, D. L. Hardie, I. C. MacLennan, J. Kappler and

L.K. Denzin for kindly providing antibodies. L.G. was supported in part by a studentship from INSERM (U-743).

## 2.10. Abbreviations

APC, antigen presenting cell; BM, bone marrow; DC, dendritic cells; ER, endoplasmic reticulum; FO, follicular B-cells; li, Invariant chain; IP, immunoprecipitations; MFV, mean fluorescence value; MIF, macrophage migration inhibitory factor; mli, murine li; MZ, marginal zone B-cells; T1, transitional 1 B -cells; T2, transitional 2 B-cells; pMHC II, peptide-MHC II complexes.

## 2.11. References

- 1 Roche, P. A., Marks, M. S., and Cresswell, P. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354:392.
- 2 Roche, P. A. and Cresswell, P. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615.
- 3 Roche, P. A. and Cresswell, P. 1991. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3150.
- 4 Bremnes, B., Madsen, T., Gedde-Dahl, M., and Bakke, O. 1994. An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J. Cell Sci.* 107 ( Pt 7):2021.
- 5 Odorizzi, C. G., Trowbridge, I. S., Xue, L., Hopkins, C. R., Davis, C. D., and Collawn, J. F. 1994. Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J. Cell Biol.* 126:317.
- 6 Pieters, J., Bakke, O., and Dobberstein, B. 1993. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell Sci.* 106 ( Pt 3):831.
- 7 Zecher, R., Ballhausen, W., Reske, K., Linder, D., Schluter, M., and Stirm, S. 1984. The invariant chains of mouse class II antigens: biochemical properties and molecular relationship. *Eur. J. Immunol.* 14:511.
- 8 Bijlmakers, M. E., Benaroch, P., and Ploegh, H. L. 1994. Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated Invariant chain. *J. Exp. Med.* 180:623.
- 9 Hsing, L. C. and Rudensky, A. Y. 2005. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 207:229.

- 10 Kelly, A. P., Monaco, J. J., Cho, S., and Trowsdale, J. 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 353:571.
- 11 Avva, R. R. and Cresswell, P. 1994. In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. *Immunity*. 1:763.
- 12 Riberdy, J. M., Avva, R. R., Geuze, H. J., and Cresswell, P. 1994. Transport and intracellular distribution of MHC class II molecules and associated invariant chain in normal and antigen-processing mutant cell lines. *J. Cell Biol.* 125:1225.
- 13 Berger, A. C. and Roche, P. A. 2009. MHC class II transport at a glance. *J. Cell Sci.* 122:1.
- 14 Viville, S., Neefjes, J. J., Lotteau, V., Dierich, A., Lemeur, M., Ploegh, H., Benoist, C., and Mathis, D. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635.
- 15 Bikoff, E. K., Huang, L.-Y., Episkopou, V., van Meerwijk, J., Germain, R. N., and Robertson, E. J. 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med.* 177:1699.
- 16 Elliott, E. A., Drake, J. R., Amigorena, S., Elsemore, J., Webster, P., Mellman, I., and Flavell, R. A. 1994. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 179:681.
- 17 Dornmair, K., Rothenhausler, B., and McConnell, H. M. 1989. Structural intermediates in the reactions of antigenic peptides with MHC molecules. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54 Pt 1:409.
- 18 Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12:259.
- 19 Tourne, S., Nakano, N., Viville, S., Benoist, C., and Mathis, D. 1995. The influence of invariant chain on the positive selection of single T cell receptor specificities. *Eur. J. Immunol.* 25:1851.
- 20 Wong, P. and Rudensky, A. Y. 1996. Phenotype and function of CD4<sup>+</sup> T cells in mice lacking invariant chain. *J. Immunol.* 156:2133.
- 21 Bikoff, E. K., Germain, R. N., and Robertson, E. J. 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity*. 2:301.
- 22 Shachar, I. and Flavell, R. A. 1996. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science* 274:106.
- 23 Koonce, C. H. and Bikoff, E. K. 2004. Dissecting MHC class II export, B cell maturation, and DM stability defects in invariant chain mutant mice. *J. Immunol.* 173:3271.
- 24 Benlagha, K., Park, S. H., Guinamard, R., Forestier, C., Karlsson, L., Chang, C. H., and Bendelac, A. 2004. Mechanisms governing B cell developmental defects in invariant chain-deficient mice. *J. Immunol.* 172:2076.
- 25 Matza, D., Kerem, A., and Shachar, I. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol.* 24:264.
- 26 Labrecque, N., Madsen, L., Fugger, L., Benoist, C., and Mathis, D. 1999. Toxic MHC class II beta chains. *Immunity*. 11:515.
- 27 Maehr, R., Kraus, M., and Ploegh, H. L. 2004. Mice deficient in invariant-chain and MHC class II exhibit a normal mature B2 cell compartment. *Eur. J. Immunol.* 34:2230.

- 28 Jayawardena-Wolf, J., Benlagha, K., Chiu, Y. H., Mehr, R., and Bendelac, A. 2001. CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity*. 15:897.
- 29 Sugita, M. and Brenner, M. B. 1995. Association of the invariant chain with major histocompatibility complex class I molecules directs trafficking to endocytic compartments. *J. Biol. Chem.* 270:1443.
- 30 Ye, L., Liu, X., Rout, S. N., Li, Z., Yan, Y., Lu, L., Kamala, T., Nanda, N. K., Song, W., Samal, S. K., and Zhu, X. 2008. The MHC class II-associated invariant chain interacts with the neonatal Fc gamma receptor and modulates its trafficking to endosomal/lysosomal compartments. *J. Immunol.* 181:2572.
- 31 Zwart, W., Peperzak, V., de, V. E., Keller, A. M., van der Horst, G., Veraar, E. A., Geumann, U., Janssen, H., Janssen, L., Naik, S. H., Neefjes, J., and Borst, J. 2010. The invariant chain transports TNF family member CD70 to MHC class II compartments in dendritic cells. *J. Cell Sci.* 123:3817.
- 32 Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R. A., and Bucala, R. 2003. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* 197:1467.
- 33 Beswick, E. J., Pinchuk, I. V., Minch, K., Suarez, G., Sierra, J. C., Yamaoka, Y., and Reyes, V. E. 2006. The Helicobacter pylori urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect. Immun.* 74:1148.
- 34 Faure-Andre, G., Vargas, P., Yuseff, M. I., Heuze, M., Diaz, J., Lankar, D., Steri, V., Manry, J., Hugues, S., Vascotto, F., Boulanger, J., Raposo, G., Bono, M. R., Rosemblatt, M., Piel, M., and Lennon-Dumenil, A. M. 2008. Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science* 322:1705.
- 35 Stumptner-Cuvelette, P., Morchoisne, S., Dugast, M., Le Gall, S., Raposo, G., Schwartz, O., and Benaroch, P. 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:12144.
- 36 Lennon-Dumenil, A. M., Roberts, R. A., Valentijn, K., Driessen, C., Overkleeft, H. S., Erickson, A., Peters, P. J., Bikoff, E., Ploegh, H. L., and Wolf, B. P. 2001. The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L. *EMBO J.* 20:4055.
- 37 Strubin, M., Berte, C., and Mach, B. 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 5:3485.
- 38 Lamb, C. A. and Cresswell, P. 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J. Immunol.* 148:3478.
- 39 Anderson, H. A., Bergstrahl, D. T., Kawamura, T., Blauvelt, A., and Roche, P. A. 1999. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J. Immunol.* 163:5435.
- 40 Marks, M. S., Blum, J. S., and Cresswell, P. 1990. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J. Cell Biol.* 111:839.
- 41 Newcomb, J. R. and Cresswell, P. 1993. Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J. Immunol.* 151:4153.

- 42 Khalil, H., Brunet, A., Saba, I., Terra, R., Sekaly, R. P., and Thibodeau, J. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int. Immunol.* 15:1249.
- 43 Anderson, H. A. and Roche, P. A. 1998. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J. Immunol.* 160:4850.
- 44 Kuwana, T., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1998. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95:1056.
- 45 Warmerdam, P. A., Long, E. O., and Roche, P. A. 1996. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J. Cell Biol.* 133:281.
- 46 Wang, K., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1997. Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J. Biol. Chem.* 272:17055.
- 47 van Santen, H., Benoist, C., and Mathis, D. 2000. A cassette vector for high-level reporter expression driven by a hybrid invariant chain promoter in transgenic mice. *J. Immunol. Methods* 245:133.
- 48 Wraith, C. J., Van Endert, P., Moller, P., Lipp, J., Ling, N. R., MacLennan, I. C., Koch, N., and Moldenhauer, G. 1990. Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J. Biol. Chem.* 265:5787.
- 49 Lacombe, M. H., Hardy, M. P., Rooney, J., and Labrecque, N. 2005. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8+ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J. Immunol.* 175:4400.
- 50 Glimcher, L. H., Polla, B. S., Poljak, A., Morton, C. C., and McKean, D. J. 1987. Murine class II (Ia) molecules associate with human invariant chain. *J. Immunol.* 138:1519.
- 51 Eastman, S., Deftos, M., DeRoos, P. C., Hsu, D. H., Teyton, L., Braunstein, N. S., Hackett, C. J., and Rudensky, A. 1996. A study of complexes of class II invariant chain peptide: Major histocompatibility complex class II molecules using a new complex- specific monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 26:385.
- 52 Pierre, P., Shachar, I., Matza, D., Gatti, E., Flavell, R. A., and Mellman, I. 2000. Invariant chain controls H2-M proteolysis in mouse splenocytes and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 191:1057.
- 53 Sadegh-Nasseri, S. and Germain, R. N. 1991. A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* 353:167.
- 54 Germain, R. N. and Hendrix, L. R. 1991. MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* 353:134.
- 55 Honey, K., Forbush, K., Jensen, P. E., and Rudensky, A. Y. 2004. Effect of decreasing the affinity of the class II-associated invariant chain peptide on the MHC class II peptide repertoire in the presence or absence of H-2M. *J. Immunol.* 172:4142.
- 56 Zhu, Y., Rudensky, A. Y., Corper, A. L., Teyton, L., and Wilson, I. A. 2003. Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-Ab peptide-binding motif. *J. Mol. Biol.* 326:1157.

- 57 Beck, B. N., Buerstedde, J. M., Krco, C. J., Nilson, A. E., Chase, C. G., and McKean, D. J. 1986. Characterization of cell lines expressing mutant I-A<sup>b</sup> and I-A<sup>k</sup> molecules allows the definition of distinct serologic epitopes on A alpha and A beta polypeptides. *J. Immunol.* 136:2953.
- 58 Matza, D., Lantner, F., Bogoch, Y., Flaishon, L., Hershkoviz, R., and Shachar, I. 2002. Invariant chain induces B cell maturation in a process that is independent of its chaperonic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:3018.
- 59 Kuwana, T., Peterson, P. A., and Karlsson, L. 1998. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:1056.
- 60 Su, T. T., Guo, B., and Rawlings, D. J. 2002. Emerging roles for PKC isoforms in immune cell function. *Mol. Interv.* 2:141.

## 2.12. Figure legends

### **Fig. 2-1 : Expression of lip35 in APCs.**

Cells of different origins were isolated, permeabilized with saponin and stained with either BU45 or In-1 and different lineage-specific mAbs. The percentage of cells expressing li is indicated. **(A)** The spleens were removed and digested with collagenase D and DNase and then isolated on a 14% nycodenz gradient. Collected cells were stained with BU45 or In-1, anti-CD11c and I-A<sup>b</sup> (28-16-8S). **(B)** Splenocytes were stained with BU45 or In-1, anti-CD19 and I-A<sup>b</sup> (28-16-8S). **(C)** Statistical significance of the data obtained in panel B was determined using a Student's *t* test. In the left panel, expression of mli was measured on CD19<sup>+</sup> cells. In the right panel, mli expression was compared between CD19<sup>+</sup> lip35<sup>-</sup> and CD19<sup>+</sup> lip35<sup>+</sup> spleen cells isolated from Tgp35 mice. Error bars indicate the standard deviation (SD). **(D)** BM was removed from tibia and femur and collected cells were cultured for 7 days in the presence of GM-CSF and IL-4. DCs were then isolated on a 14% nycodenz gradient and stained with BU45 or In-1 and anti-CD11b. Data are representative of at least five independent experiments.

**Fig. 2-2 : Interaction of lip35 with murine Ii and MHC II molecules.**

**(A and B)** Splenocyte lysates were immunoprecipitated with Pin-1, anti-I-A<sup>b</sup> (28-16-8S), In-1 or isotypic antibody overnight at 4°C. Samples were then boiled for 5 min and analyzed on SDS-PAGE (12%) under reducing conditions. After transfer on nitrocellulose membrane, samples were probed with Pin-1 **(A)** or In-1 **(B)**. The bracket ( ) marks the location of the light chains of various antibodies used for immunoprecipitations. Arrows indicate murine Ii31 or human Ii35. **(C)** Splenocytes were stained with anti-CD19 and BU45. The overlay shows hIi expression gated on CD19+ cells. **(D)** Immunoprecipitations were performed using the D-6 mAb and the presence of Ii was detected on immunoblots using D-6. Arrows indicate the different processed forms of Ii. **(E)** Splenocytes were stained for CD19, permeabilized and stained with the 30-2 mAb. Data are representative of at least three independent experiments. **(F)** Splenocytes were stained for CD19, permeabilized and stained with 30-2 and BU45. CD19<sup>+</sup> and BU45<sup>+</sup> cells were gated by flow cytometry and the MFVs for 30-2 expression were plotted. The bar chart is a compilation of three independent experiments. Student's *t* test *P* value is indicated. Error bars represent the SD.

**Fig. 2-3 : Ii35 chaperones I-A<sup>b</sup>.**

**(A)** Splenocytes were lysed, boiled and analyzed by SDS-PAGE (12%) under reducing conditions using the I-A<sup>b</sup>-specific KL295 mAb. **(B)** Cell lysates were boiled for 5 min ('B') or heated at 65°C ('NB') and analyzed by SDS-PAGE (12%) under non-reducing conditions. Samples were analyzed on immunoblots probed with the I-A<sup>b</sup>-specific M5/114 mAb. 'C' and 'F' indicate compact and floppy forms, respectively. The arrowhead points to aggregated MHC II products. The samples were blotted with an actin-specific mAb to monitor for variations in protein loading. Data are representative of at least three independent experiments. **(C)** The experiment was performed as in (B) but Ii35-

expressing splenocytes were sorted with D-6-coated magnetic beads before cell lysis. **(D)** Splenocytes were incubated for 6 h at 37°C with a biotinylated CLIP peptide (50 µM). The cells were permeabilized and stained with BU45. Data are representative of two independent experiments.

**Fig. 2-4 : lip35 increases MHC II surface expression.**

**(A)** Splenocytes were stained for surface I-A<sup>b</sup> with the AF6-120.1 mAb. Data are representative of six independent experiments. **(B)** MFVs obtained for panel A were normalized for each experiment to the value obtained for wild-type cells. One-way ANOVA test *P* value is indicated by asterisks (\*\*\*, *P* < 0.001). **(C)** Splenocytes were stained with anti-CD19 and anti-I-A<sup>b</sup> (AF6-120.1) mAbs prior to permeabilization and staining with BU45. The ellipse indicates the I-A<sup>low</sup>BU45<sup>high</sup> population. Data are representative of at least three independent experiments.

**Fig. 2-5 : The absence of mli alters the conformation of I-A<sup>b</sup>.**

Splenocytes were stained for I-A<sup>b</sup> either after (total; **A, B, D and F**) or before (surface; **C and E**) permeabilization with the following mAbs: AF6-120.1 (**A and B**), 28-16-8S (**C and D**) and M5/114 (**E and F**). Data are representative of at least three independent experiments. **(B)** Compilation of normalized AF6-120.1 total expression from four different experiments. One-way ANOVA test *P* value is indicated by asterisks (\*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01).

**Fig. 2-6 : Mature B-cells accumulate MHC II molecules with an AF6-120.1<sup>+</sup> conformation.**

(A) Splenocytes were stained for IgD and I-A<sup>b</sup> (AF6-120.1) before permeabilization and stained for lip35 (BU45). (B) Cells were stained for IgD, permeabilized and stained for I-A<sup>b</sup> (AF6-120.1) and lip35 (BU45). Cells were gated on the IgD<sup>high</sup> population. Data are representative of at least three independent experiments. (C) Splenocytes were lysed and I-A<sup>b</sup> was immunoprecipitated with AF6-120.1. Samples were boiled and analyzed on SDS-PAGE (12%) under reducing conditions using KL295.

**Fig. 2-7 : Expression of lip35 in immature BM B-cells.**

(A) BM was removed from tibia and femur and collected cells were stained with anti-B220, permeabilized and stained with either BU45 (hli, left panel) or In-1 (mli, right panel). (B) Cells were stained for I-A<sup>b</sup> (28-16-8S) and B220 before permeabilization and staining with BU45. (C) Data were expressed as histograms to compare the expression of MHC II molecules in the B220<sup>hi</sup> populations. Data are representative of at least three independent experiments.

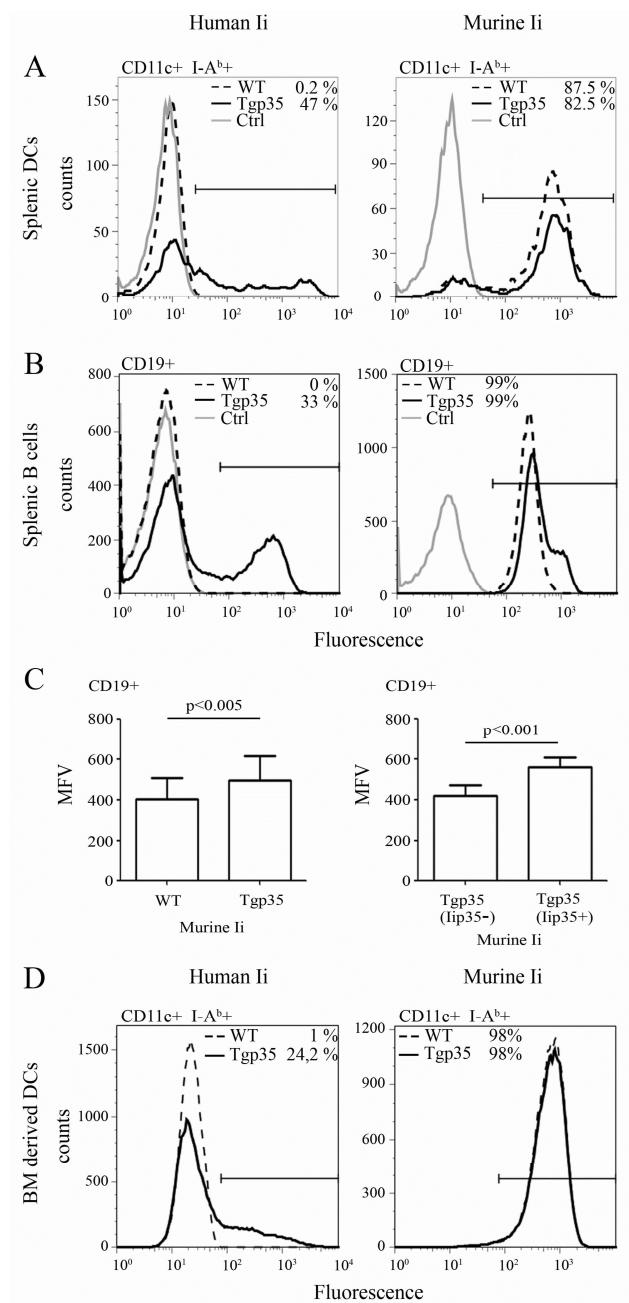
**Fig. 2-8 : T1 cells hli<sup>high</sup> do not up-regulate MHC II levels.**

(A and B) Splenocytes were stained with anti-IgD, -CD21 and -I-A<sup>b</sup> (AF6-120.1) prior to permeabilization and staining with BU45. T1 cells were gated (CD21<sup>low</sup> IgD<sup>low</sup>) and analyzed for lip35 and I-A<sup>b</sup>. The percentage of T1 cells expressing p35 (A) and the MFV of I-A<sup>b</sup> expression (B) are indicated. Data are representative of three independent experiments. (C) Compilation of normalized AF6-120.1 surface expression obtained from the different experiments. One-way ANOVA test *P* value is indicated by asterisks (\*, *P* < 0.05).

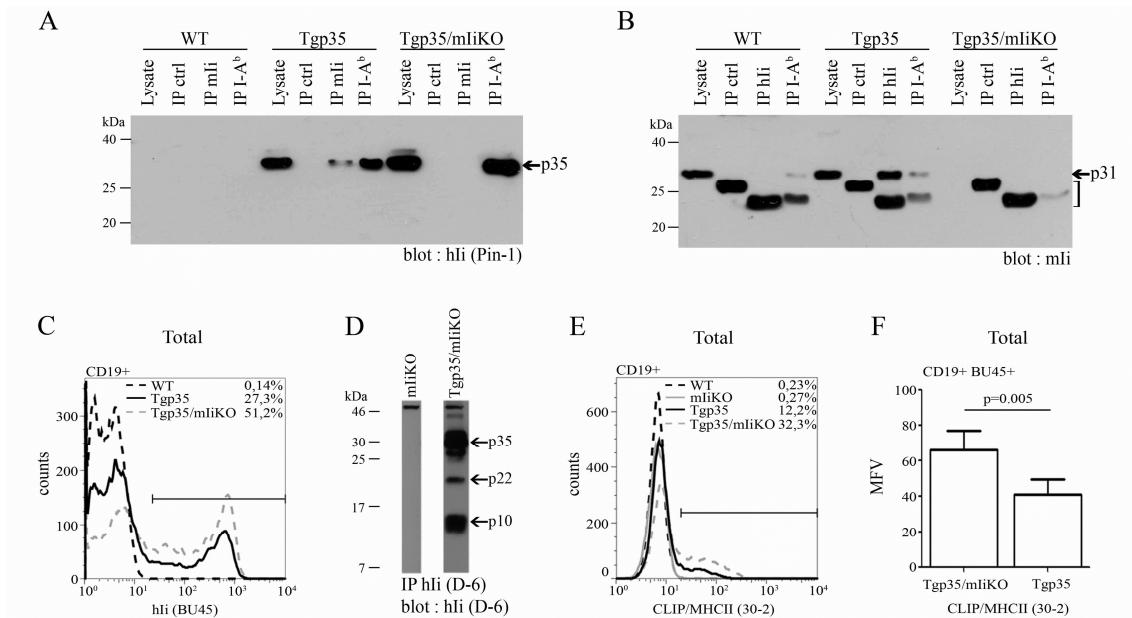
**Fig. 2-9 : lip35 restores the mature B-cell compartment.**

**(A-E)** Splenocytes were stained with anti-IgD, -CD21 and -CD19 prior to permeabilization and staining with BU45. Cells were gated on CD19. Cells expressing high **(B and D)** or intermediate **(C and E)** levels of hli were also analyzed. The percentages of T1 (CD21<sup>low</sup> IgD<sup>low</sup>), MZ (CD21<sup>high</sup> IgD<sup>low</sup>) and T2-FO (CD21<sup>+</sup> IgD<sup>high</sup>) cells are indicated in the corresponding gates. Data are representative of five independent experiments. **(D-E)** Percentages of B-cells obtained for the different gates in five different experiments were plotted. Error bars represent the standard deviations (SD). Two-way ANOVA test *P* value is indicated by asterisks (\*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01).

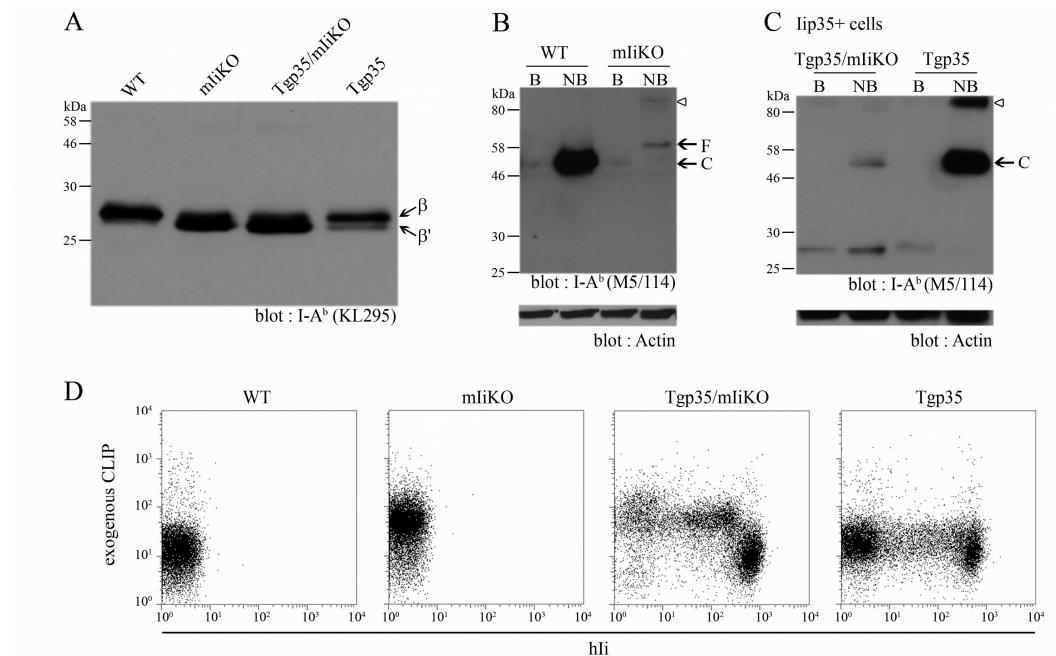
## 2.13. Figures



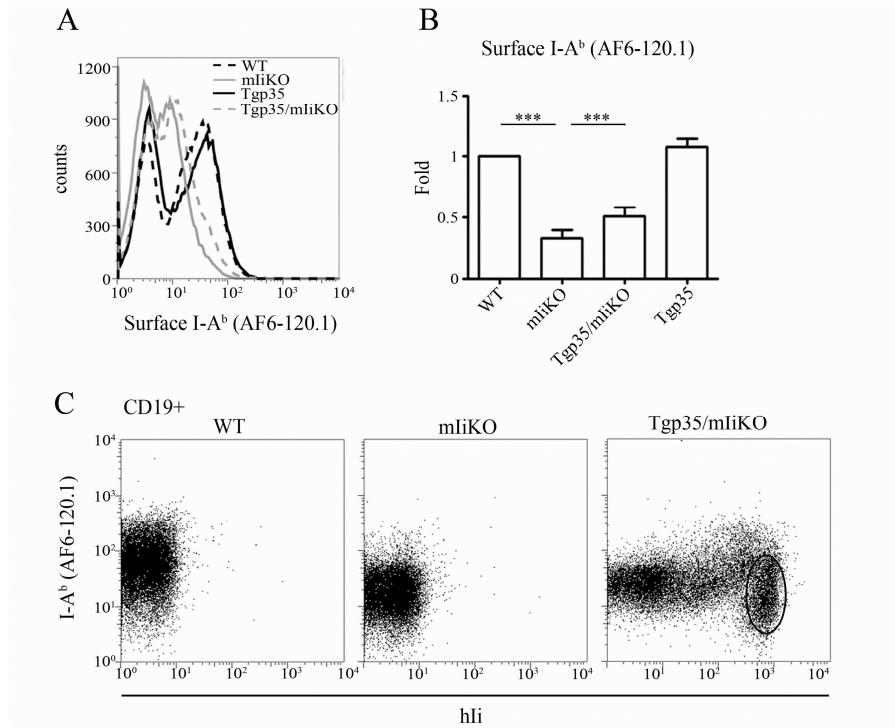
**Figure 2-1 : Expression of lip35 in APCs.**



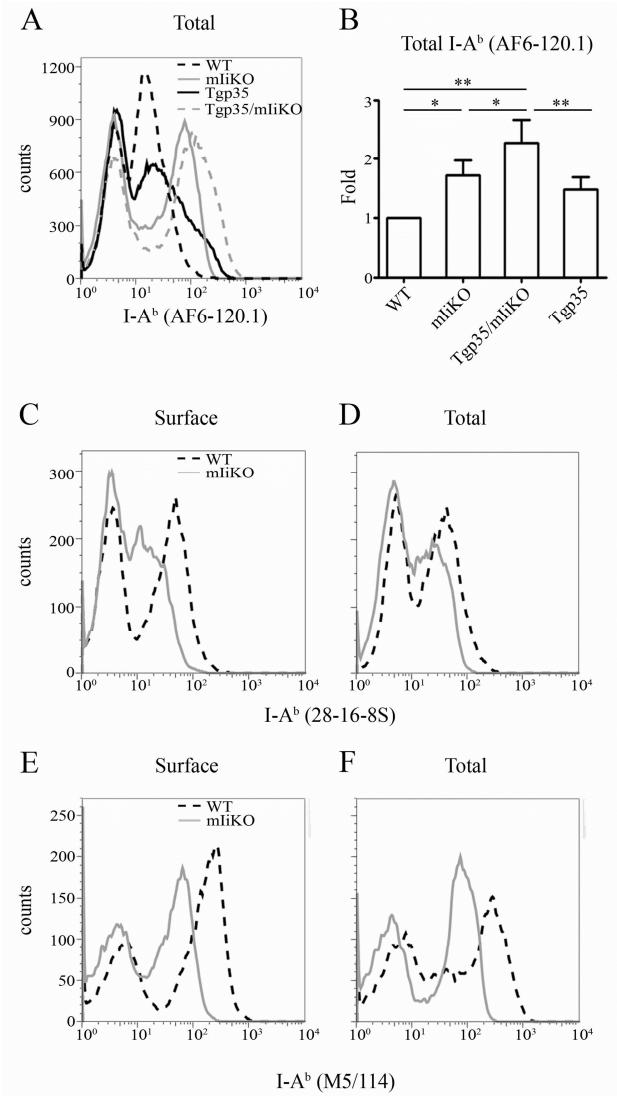
**Figure 2-2 : Interaction of lip35 with murine Ii and MHC II molecules.**



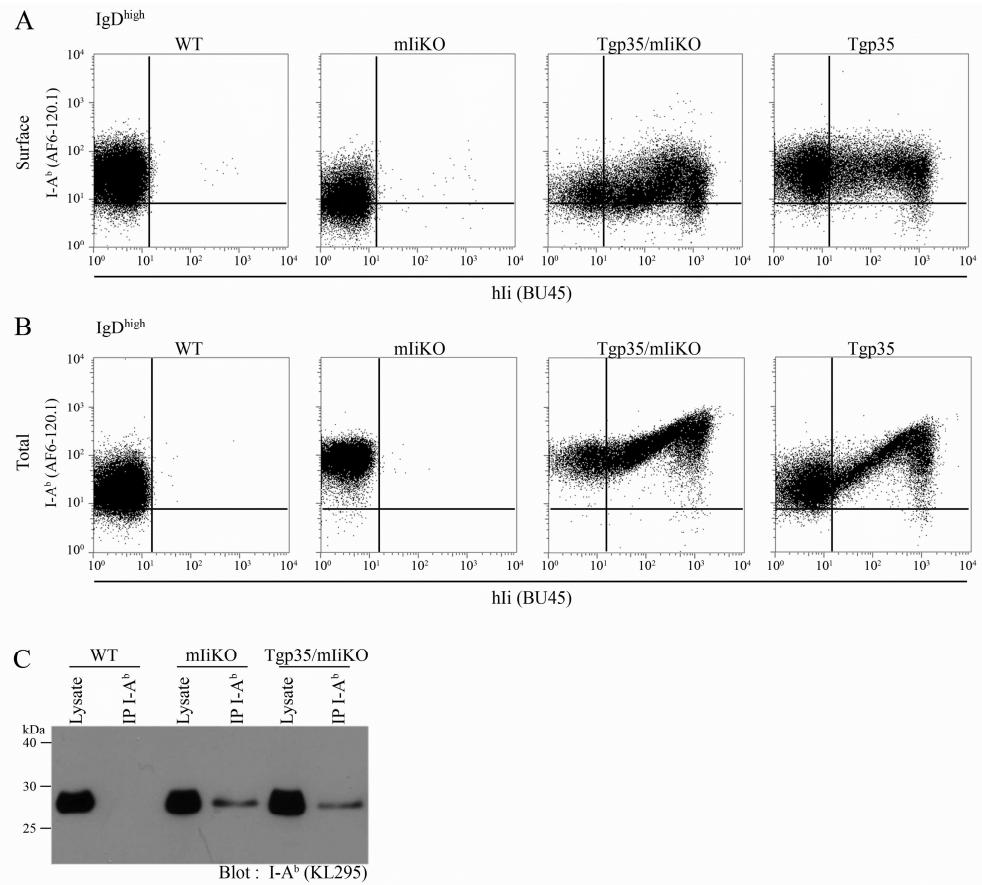
**Figure 2-3 : lip35 chaperones I-A<sup>b</sup>.**



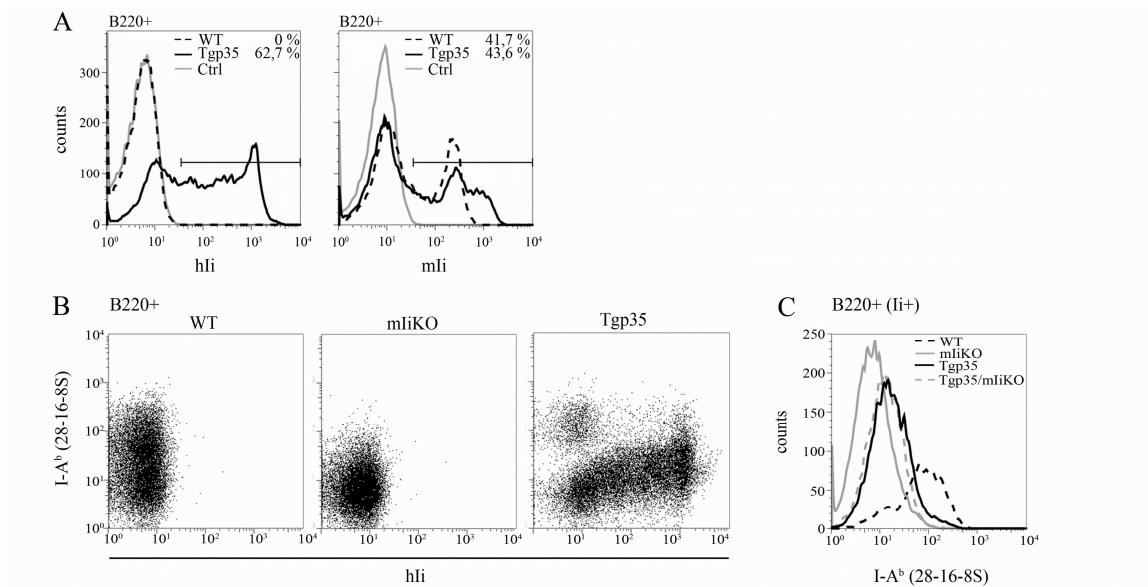
**Figure 2-4 : lip35 increases MHC II surface expression.**



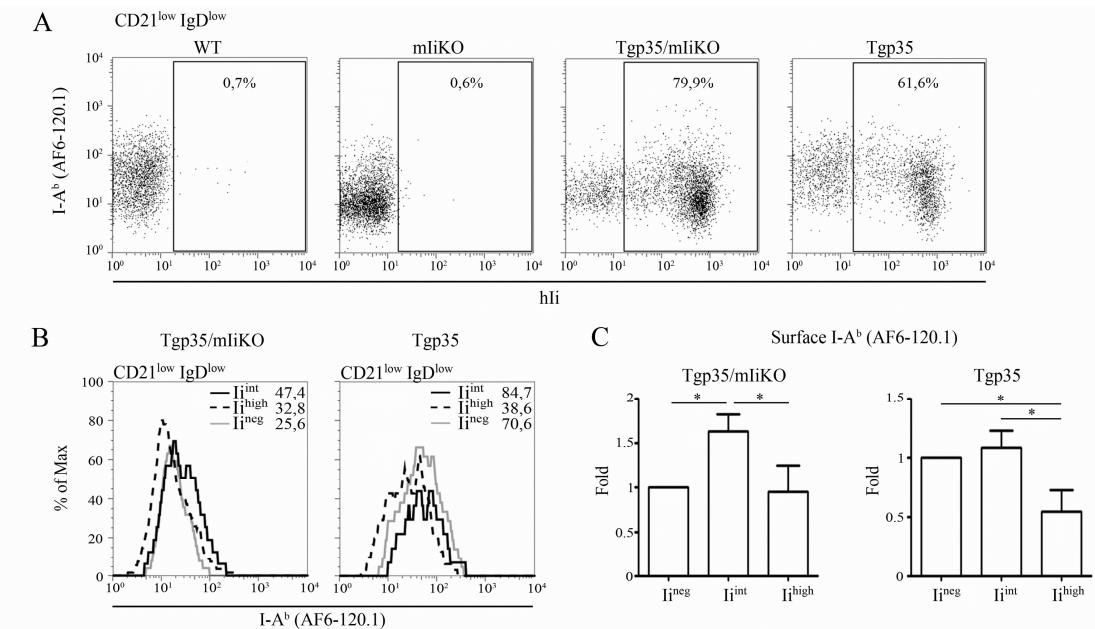
**Figure 2-5 : The absence of *mli* alters the conformation of I-A<sup>b</sup>.**



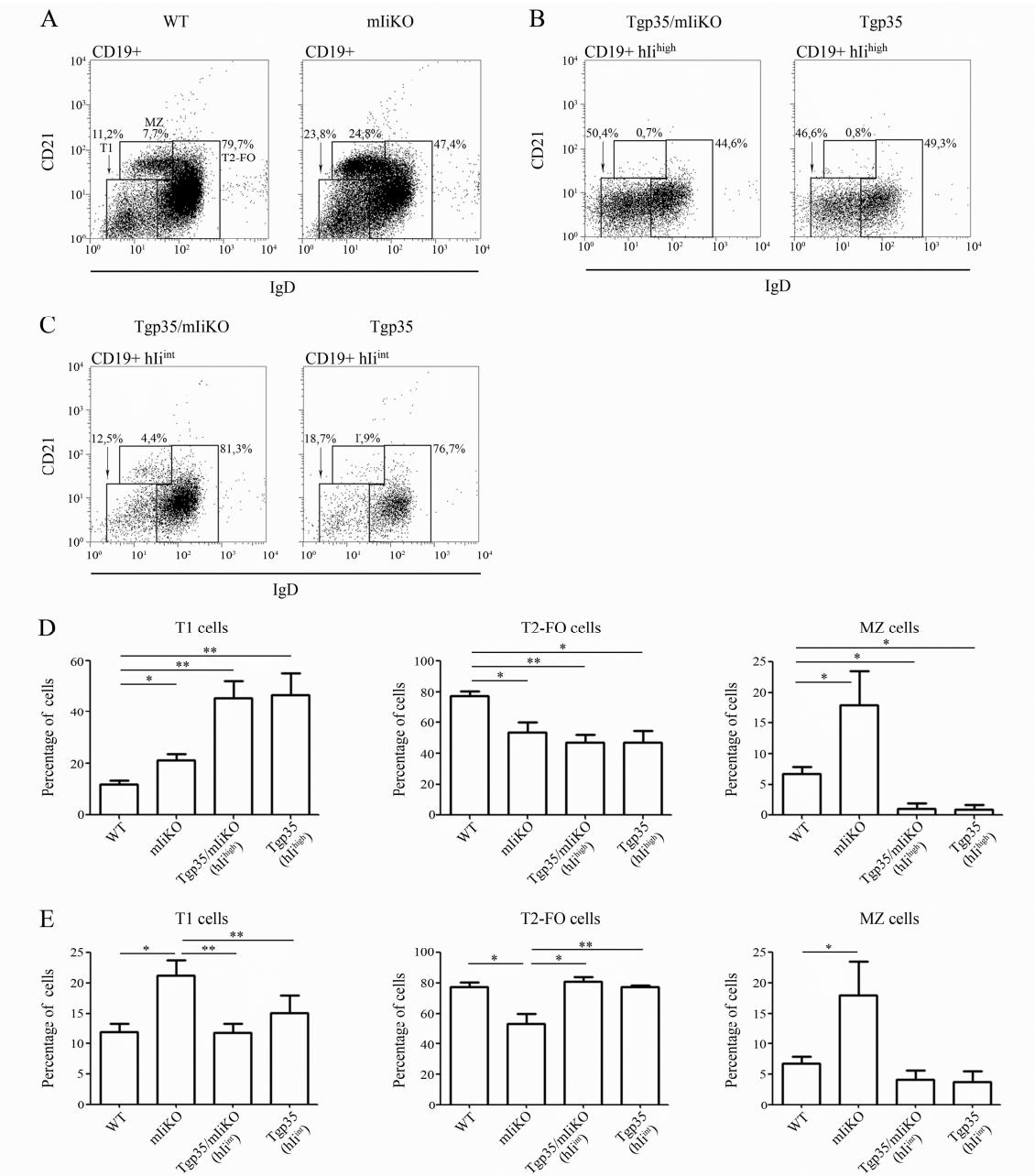
**Figure 2-6 : Mature B-cells accumulate MHC II molecules with an AF6-120.1<sup>+</sup> conformation.**



**Figure 2-7 : Expression of lip35 in immature BM B-cells.**

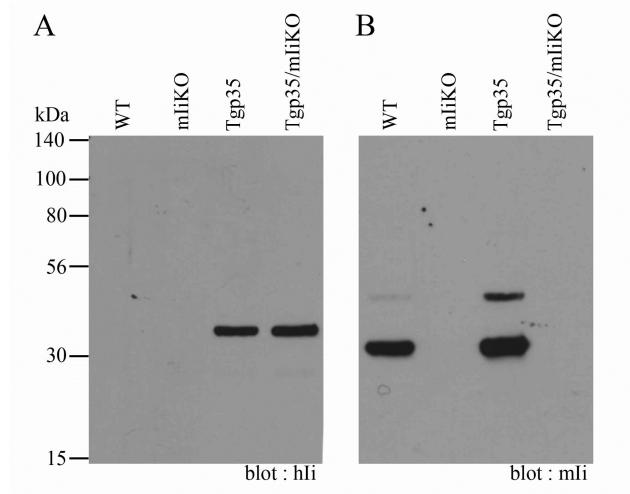


**Figure 2-8 : T1 cells hIi<sup>high</sup> do not up-regulate MHC II levels.**



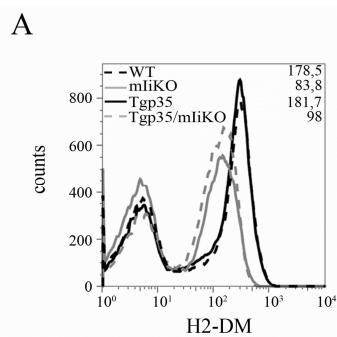
**Figure 2-9 : lip35 restores the mature B-cell compartment.**

## 2.14. Supplementary data



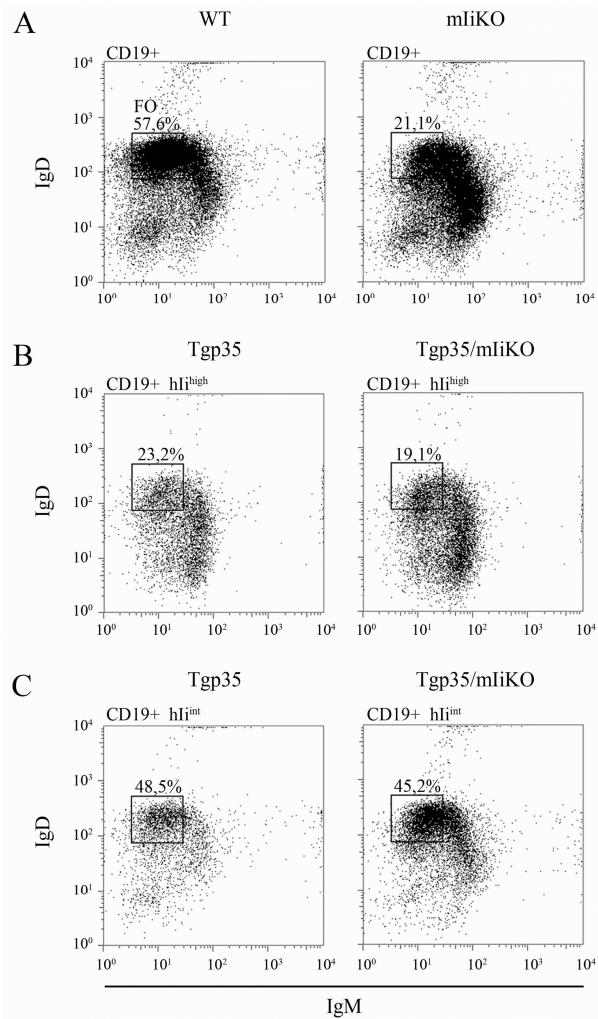
**Figure 2-10 : Supplementary figure S1.**

Human lip35 is expressed in splenocytes of transgenic mice. Splenocyte lysates were boiled 5 min and analysed on 12% SDS-PAGE under reducing conditions. Proteins were transferred on nitrocellulose membrane and probed for the presence of human li using Pin-1 (A) and murine li using In-1 (B). Data are representative of at least four independent experiments.



**Figure 2-11 : Supplementary figure S2.**

Splenocytes were permeabilized and stained with mAbs for H2-DM and lip35. The mean fluorescence value is indicated. Data are representative of three independent experiments.



**Figure 2-12 : Supplementary figure S3.**

Splenocytes were stained for CD19, IgD and IgM, permeabilized and stained with BU45. Cells were gated either on CD19+ cells (A), CD19+  $\text{lip35}^{\text{high}}$  cells (B) or CD19+  $\text{lip35}^{\text{int}}$  cells (C). The percentage of FO cells ( $\text{IgD}^{\text{high}} \text{ IgM}^{\text{int}}$ ) is indicated. Data are representative of three independant experiments.

# Chapitre 3. Résultats de l'article n°2

---

## 3.1. Contribution des auteurs

J'ai génotypé et réalisé les croisements de souris ainsi que géré la colonie de souris. J'ai réalisé et analysé toutes les expériences (sauf la présentation antigénique *in vitro*) et produit toutes les figures présentées dans cet article. Magali Chemali a planifié, réalisé et analysé l'expérience de présentation antigénique *in vitro*. Michel Desjardins a supervisé cette expérience. Nathalie Labrecque a apporté l'expertise pour la gestion de la colonie de souris ainsi que pour la planification et l'analyse des expériences. Elle a fourni des réactifs essentiels. Jacques Thibodeau a planifié le projet et les expériences et a analysé les résultats. J'ai écrit l'article conjointement avec Jacques Thibodeau qui l'a revu et corrigé. Les autres auteurs ont révisé l'article.

## 3.2. Human invariant chain isoform p35 restores thymic selection and antigen presentation in CD74-deficient mice

Laetitia Genève<sup>1</sup>, Magali Chemali<sup>2</sup>, Michel Desjardin<sup>2,3</sup>, Nathalie Labrecque<sup>3,4,5</sup> and Jacques Thibodeau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Canada.

<sup>2</sup> Département de Pathologie et Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Canada.

<sup>3</sup> Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Canada.

<sup>4</sup> Département de Médecine, Université de Montréal, Canada.

<sup>5</sup> Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, Canada

**Running title:** Transgenic mouse expressing human Iip35

<sup>1</sup> Correspondence : Dr J Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

**Status :** published in Immunology & Cell biology

Received 23 January 2012; revised 17 April 2012; accepted 19 April 2012

Immunology and Cell Biology (2012) 0, 000–000. doi:10.1038/icb.2012.27

### 3.3. Abstract

The invariant chain (Ii) has pleiotropic functions and is a key player in antigen presentation. Ii associates with MHC class II molecules in the endoplasmic reticulum (ER) and targets the complex in the endocytic pathway to allow antigenic peptide loading. The human lip35 isoform includes a cytoplasmic extension containing a di-arginine motif causing ER retention. This minor isoform does not exist in mice and its function in humans has not been thoroughly investigated. We have recently generated transgenic mice expressing lip35 and these were crossed with Ii-deficient mice to generate animals (Tgp35/mliKO) expressing exclusively the human isoform. In these mice, we show that lip35 is expressed in antigen presenting cells and is inducible by interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). Despite the low constitutive expression of the protein and some minor differences in the V $\beta$  repertoire of Tgp35/mliKO mice, lip35 restored thymic selection of CD4 $^{+}$  T cells and of invariant NK T cells. *In vitro* functional assays using purified primary macrophages treated with IFN- $\gamma$  showed that lip35 allows presentation of an Ii-dependent ovalbumin T cell

epitope. Altogether, our results suggest that lip35 is functional and does not require co-expression of other isoforms for antigen presentation.

**Keywords:** antigen presentation, CD74, lip35, invariant chain, knock-out mice, superantigens.

### 3.4. Introduction

The invariant chain (Ii; CD74) is a type II chaperone protein involved in antigen presentation. Ii assists the folding of MHC class II molecules (MHC II) in the endoplasmic reticulum (ER) and prevents the loading of nascent polypeptides into the peptide binding groove (reviewed in Stumptner-Cuvelette and Benaroch<sup>1</sup>). Di-leucine-like motifs present in the cytoplasmic tail of Ii target the MHC II/Ii complex to the endocytic pathway.<sup>2,3</sup> Ii is then degraded into several intermediates, leaving only the CLIP (class II-associated invariant chain peptide) in the peptide-binding groove.<sup>4</sup> In late endosomal compartments, a non-classical MHC class II molecule called HLA-DM (H2-DM in mice) catalyzes the exchange of CLIP for a high affinity peptide.<sup>5,6</sup> Mice express two different isoforms of Ii (lip31 and lip41) that originate from differential mRNA splicing and which differ by the presence of a luminal thyroglobulin-like domain capable of inhibiting cathepsins.<sup>7</sup>

Ii-deficient mice display lower levels of MHC II on the surface of APCs.<sup>8-10</sup> Ii-deficiency on the H-2<sup>b</sup> background produces mostly floppy MHC II molecules, suggesting that these are empty or loosely associated with peptides.<sup>11,12</sup> The lack of Ii restricts the diversity of the MHC II-associated peptide repertoire, affecting thymic selection and leading to a decrease in the absolute numbers of CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>13</sup> The proportions of the different Vβs appeared normal but the residual CD4<sup>+</sup> T cells showed some functional defects, for example in their capacity to respond to superantigens.<sup>14,15</sup> Of note, the majority of the mature CD4<sup>+</sup> T cells have an activated phenotype that is the consequence of interactions with radioresistant epithelial cells of the thymus.<sup>15-18</sup> The study of Ii knock-

out mice also confirmed the importance of this chaperone in CD1d-restricted thymic selection of invariant natural killer T cells (iNKT).<sup>19</sup>

The human homologs of mouse li are called lip33 and lip41. The mRNAs for lip33 and lip41 can also give rise to the lip35 and lip43 isoforms, respectively, due to the usage of an upstream alternative start codon.<sup>20,21</sup> lip33 and lip35 are the most abundant polypeptides with lip33 representing 80% of the li protein pool.<sup>22-24</sup> The 16 N-terminal amino acid cytoplasmic extension found in lip35 and lip43 contains a di-arginine (R-X-R) motif causing ER retention.<sup>25,26</sup> Upon MHC II binding and phosphorylation of neighboring serines, the R-X-R retention motif is masked and the complex egress the ER.<sup>27-29</sup> Interestingly, mixed li trimers containing a single lip35 are retained in the ER in absence of MHC II.<sup>23,30</sup>

The exact function of lip35 is nebulous and the possibility of controlling antigen presentation through selective expression or phosphorylation of lip35 remains hypothetical. To gain insights into the biological roles of lip35, we generated recently a transgenic (Tg) mouse expressing exclusively this isoform.<sup>31</sup> Here, we evaluated the capacity of lip35 to restore thymic T cell selection and to allow the presentation of an li-dependent antigen on MHC II molecules.

### 3.5. Results

#### **lip35 is expressed in APCs**

We have recently generated transgenic mice expressing the human lip35 isoform under the control of the mouse li promoter cloned in pDOI-6.<sup>32</sup> In these Tgp35 mice, we found that lip35 was expressed in a large fraction of immature and mature B cells as well as in DCs.<sup>31</sup> To further characterize the expression pattern of lip35 and its role in shaping the T cell repertoire, macrophages and thymic epithelial cells (TECs) were purified from Tg mice expressing the human isoform as well as the endogenous mli and analyzed by flow

cytometry. The mouse li and the lip35 were found in about one fifth of the CD11b<sup>+</sup> cells peritoneal cells (Figure. 3-1a). Both chains were strongly induced by interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in macrophages. However, a small population does not express the transgene as only 74% of treated cells expressed lip35 compared to 95% for the endogenous mli. These results show that the mli gene promoter in pDOI-6 is inducible by IFN- $\gamma$ . We then assessed the pattern of expression of lip35 in the thymus. For the Tgp35 mice, about twice as many thymic epithelial cells (TECs) express the endogenous li as compared to lip35 (Figure. 3-1b). This percentage is lower in the Tgp35/mliKO mice. However, lip35 is expressed at low levels in some CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> thymocytes, suggesting that transcriptional regulation of the li promoter in pDOI-6 is leaky in these mice (Figures. 3-1c and d).

### **lip35 restores thymic selection.**

Studies on mice have shown that thymic selection is defective in the absence of li, resulting in a decreased number of CD4<sup>+</sup> T cells both in the thymus and periphery.<sup>8-10</sup> In order to study exclusively lip35, we used Tgp35/mliKO animals that were obtained by crossing our Tgp35 with li-deficient mice.<sup>31</sup> Our results confirmed the low proportion of mature single positive CD4<sup>+</sup> T cells observed previously in li-deficient animals (Figures. 3-2a and b). Interestingly, in both the thymus and spleen, expression of lip35 compensated for the loss of the endogenous mli and fully restored the single positive CD4<sup>+</sup> T cell compartment. This effect was observed despite the fact that the overall I-A<sup>b</sup> levels in the Tgp35/mliKO TECs were only slightly increased by the expression of lip35 (Figure. 3-2c). Also, the percentage of TECs expressing lip35 is low in the Tgp35 and is down to 4.3% in the Tgp35/mliKO (Figure. 3-1b).

Although the expression of lip35 restored CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T cell numbers, the possibility remained that the V $\beta$  usage may be biased by some specific peptides or polypeptides associated with MHC II molecules. The integrity of the T cell repertoire was assessed on

isolated lymph node cells by flow cytometry using a panel of V $\beta$ -specific mAbs. The results showed no difference between the mice expressing mli or lip35, except for V $\beta$ 5, 8.1-8.2, and 17 (Figure. 3-2d). In the case of V $\beta$ 8 T cells, the slight reduction in Tgp35/mliKO may reflect the presence of a peculiar MHC II-peptide combination that affects thymic selection. Interestingly, we observed an increase in the proportions of V $\beta$ 5 and V $\beta$ 17 CD4 $^{+}$  T cells in the absence of li. As these mice express endogenous superantigens (SAgs) that target these precise V $\beta$ s, our result is reminiscent of the defective SAg-induced negative selection described previously in li-deficient CBA/J mice.<sup>18</sup> Altogether, our results suggest that lip35 can restore peptide-mediated thymic selection of CD4 $^{+}$  T cells but the presentation of SAg remains affected.

#### **Normal levels of TCR on CD4 $^{+}$ T cells from Tg mice**

It has been shown that thymic and splenic CD4 single-positive T cells from li-deficient mice express less T-cell receptors (TCRs) at their surface.<sup>15</sup> To test if this was still the case in our lip35 transgenic mice devoid of endogenous mli, we measured by flow cytometry the expression of the CD3 complex. Our results confirmed the reduced TCR levels observed previously in li-deficient mice. Figures 3-3a and b show that CD4 $^{+}$  T cells, but not their CD8 $^{+}$  counterpart, display a marked reduction in CD3 surface expression, both in the thymus and periphery. Interestingly, the CD3 expression on Tgp35/mliKO CD4 $^{+}$  and control CD8 $^{+}$  T cells was comparable to those on the wild-type cells, demonstrating that lip35 is functional. This phenotype was confirmed on splenocytes using some TCR-specific mAbs recognizing V $\beta$ 2, 4, 9 and 10b (Figure. 3-3c).

### **lip35 restores thymic iNKT-cell numbers**

Recently, it has been shown that Ii deficiency has a negative impact on the CD1d-mediated thymic selection of iNKT-cells.<sup>19</sup> To determine if lip35 could also rescue this phenotype, we monitored the percentage of iNKT-cells in the thymus by flow cytometry using an  $\alpha$ GalCer-loaded CD1d-tetramer. As previously reported, there were twice as many iNKT cells in WT versus mli-deficient mice (Figure. 3-4). Interestingly, we found that the iNKT-cell numbers were identical between the WT and Tgp35/mliKO mice, showing that lip35 supports CD1d-mediated Ag presentation.

### **Ovalbumin (OVA) presentation in the context of lip35**

The MHC class II presentation of many antigens, including chicken OVA, is dependent on Ii expression.<sup>8,33</sup> To determine the capacity of lip35 to sustain antigen presentation, we performed *in vitro* functional assays using IFN- $\gamma$ -treated bone marrow-derived macrophages (BMDM) and the B097.10 T cell hybridoma specific for the OVA<sub>323-339</sub>-I-A<sup>b</sup> complex. Figure 3-5a shows that IFN- $\gamma$  sharply increased lip35 expression in BMDM from Tg mice. As expected, the endogenous mli was also up-regulated by IFN- $\gamma$ . Independent of Ii expression, IFN- $\gamma$  increased I-A<sup>b</sup> expression in all mice, in line with a major role of this cytokine in the transcriptional regulation of MHC II genes.<sup>34</sup>

These IFN- $\gamma$  induced APCs were pulsed with OVA-coated beads and co-cultured with the OVA-specific, I-A<sup>b</sup>-restricted T cell hybridoma. Albumin was used as negative control. Figure 3-5b shows that mliKO cells, as previously demonstrated, are inefficient in presenting the OVA antigen. Interestingly, the presence of lip35 increased by more than two fold the T cell stimulation. Still, the production of IL-2 did not reach the levels obtained using WT APCs. This is most likely due to the fact that only a fraction of macrophages express lip35 as compared to the endogenous mli (Figure. 3-1a). Altogether,

these results demonstrate that lip35 expression allows the presentation of an li-dependent T cell epitope.

### 3.6. Discussion

The li has pleiotropic functions, being involved in activities as diverse as protein trafficking, antigen presentation, signal transduction and cell motility.<sup>35</sup> The human lip35 isoform is peculiar in that it encompasses an ER retention motif that must be masked by membrane-proximal residues of the MHC II β chain to allow further trafficking.<sup>36</sup> Once at the plasma membrane, lip35 is internalized very rapidly and, as opposed to lip33, is not detected at the cell surface.<sup>37,38</sup> Importantly, lip35 is dominant and regulates the trafficking of lip33 in mixed trimers.<sup>23,30</sup> This property may allow lip35 to finely tune antigen presentation as well as some of the other functions of li. To further characterize the lip35 isoform, we generated transgenic mice on the C57BL/6, H-2<sup>b</sup> background. These mice were crossed to li-deficient mice to obtain animals expressing only the human isoform. We have previously demonstrated that lip35 is expressed in a fraction of B cells, restoring MHC II levels and allowing maturation to the follicular stage.<sup>31</sup> In the present study, we have addressed the capacity of lip35 to drive thymic selection and antigen presentation.

li-deficient mice display reduced numbers of CD4<sup>+</sup> T cells, both in the thymus and periphery. Many groups have addressed the mechanistic basis behind this phenotype. The results point to the display of a less diverse MHC II-associated peptide repertoire, causing inefficient positive selection in the thymus.<sup>14,16,17</sup> Transgenic mice expressing a single peptide-MHC combination (I-A<sup>b</sup> covalently linked to the Eα peptide) as well as H2-DM-deficient animals expressing mostly MHC II-CLIP complexes are other examples of the poor CD4<sup>+</sup> T cell selection arising from the display of a dramatically less diverse peptide repertoire.<sup>39-42</sup> As our Tgp35/mliKO mice have normal CD4<sup>+</sup> T cell numbers and that these

T cells express normal levels of TCRs, we conclude that *lip35* diversified the pool of peptides displayed at the surface of TECs, thereby reinforcing positive selection. Our results are reminiscent of those obtained previously with transgenics expressing only the murine *lip31* or *lip41* isoforms. Indeed, these mice expressed low levels of *li* and despite the fact that MHC II levels were not fully restored, the T cell repertoire appeared normal.<sup>16,17</sup> The causes for the weak TCR expression on some mature CD4<sup>+</sup> T cells of *li*-deficient animals are still speculative but the reduced MHC II display at the surface of thymic APCs and the limited diversity of bound peptides are most likely changes that will affect avidity of the selected T cells.<sup>18</sup> One hypothesis put forward by Shachar *et al.* is that these are immature cells that do not mature due to the absence of sufficient levels of peptide-MHC II complexes. Still, they would escape negative selection and survive in the periphery.<sup>17</sup>

We investigated the possibility that the expression of *lip35*, which displays peculiar intracellular sorting patterns, may select for peptides or polypeptides that skew the T cell repertoire. This allowed us to make an interesting observation: a notable difference in the V $\beta$  panel tested was the increase in the proportion of V $\beta$ 5 and V $\beta$ 17 T cells in the *li*-deficient mice as compared to wild-type animals (Figure. 3-2d). As C57BL/6 mice harbor endogenous mouse mammary tumor viruses (MMTVs) 8, 9 and 17<sup>43</sup>, it is likely that the viral superantigen (vSAg)-induced deletion is sub-optimal in the absence of *li*. The SAGs encoded by these viruses are specific for V $\beta$ 5, 11 and 17 but the deletion of V $\beta$ 11 is dependent on I-E expression. Since C57BL/6 mice do not express this MHC II isotype, V $\beta$ 11 T cell deletion could not take place.<sup>44</sup> Still, in support of a role for *li* in vSAg-mediated T cell negative selection, V $\beta$ 11 deletion did not occur either on an *li*-deficient, I-E<sup>+</sup> background.<sup>8</sup> As the absence of *li* increased the proportion of V $\beta$ 5<sup>+</sup> and V $\beta$ 17<sup>+</sup> T cells (Figure. 3-2d), our results unraveled for the first time a partial I-A-mediated, peptide-sensitive deletion in WT animals. The reason why this phenotype of *li*-deficient mice has been overlooked in a previous study testing for V $\beta$ 5<sup>+</sup> (not for V $\beta$ 17) T cell numbers (despite a small reported

increase) remains to be established but could be due to the study of mice on different backgrounds.<sup>15</sup> Although V $\beta$ 5 deletion by vSAg9 has been linked in many studies to the expression of I-E, it appears that MTV8 can also delete this V $\beta$  family.<sup>45</sup> As for V $\beta$ 17 $^+$  T cells, vSAg8-induced V $\beta$ 5 deletion may also be more efficient in the presence of I-E but still occurs on an I-E $^-$ ,I-A $^+$  background.<sup>46</sup> Interestingly, H2-DM-deficient mice also display a very limited repertoire of peptides and the deletion of V $\beta$ 5 $^+$  cells was shown to be incomplete (V $\beta$ 17 $^+$  T cells were not tested in this study).<sup>39</sup> The fact that the Tgp35/mliKO shows an intermediate phenotype between wild-type and li-deficient mice could be explained either by the presence of lip35-negative TECs. Alternatively, a biased peptide repertoire associated to MHC II molecules may reduce vSAg presentation and prevent negative selection of T cells requiring high avidity interactions. In support of this last hypothesis, lip35 did not rescue the deletion of CD8 $^+$  V $\beta$ 5 $^+$  T cells (data not shown). Indeed, the vSAg-reactive CD8 $^+$  require high avidity presentation for negative selection in an li-negative background.<sup>18</sup>

A recent report concluded that expression of li in professional APCs could support thymic development of iNKT cells.<sup>19</sup> This was inferred mainly from experiments showing that li-deficient animals developed fewer iNKT cells. Our reconstituted mice confirmed the importance of li in this process as lip35 restored iNKT cells to WT levels (Figure. 3-4). The selection of these peculiar T cells relies on interactions with various thymic CD1d-expressing cells. It is believed that NKT cell selection and development rely principally on the expression of CD1d on cortical thymocytes and that other APCs may fine tune the process.<sup>47</sup> We cannot formally rule out that the aberrant lip35 expression on thymocytes in transgenic animals may potentiate iNKT cell selection. However, as murine li is not expressed in developing thymocytes, we posit that the observed influence of lip35 is probably mediated through its capacity to chaperone CD1d in APCs.<sup>48</sup> li is thought to be involved in an extrinsic pathway, directing CD1d to the endocytic pathway and preventing

antigen loading at the plasma membrane.<sup>49,50</sup> The rapid internalization of lip35 and its localization in endosomes are characteristics certainly compatible with such functions.

Our *in vitro* results on the presentation of OVA to a murine T cell hybridoma by macrophages from the Tgp35/mliKO mice confirmed that lip35 is functional. Indeed, the OVA<sub>323-339</sub> epitope is totally dependent on li for its presentation. However, Tgp35/mliKO mice immunized twice with the OVA protein in saponine-based adjuvant did not produce any specific IgG antibodies (data not shown). Many factors could explain this result. As compared to the endogenous mli, lip35 in Tgp35/mliKO animals is expressed only in a fraction of the cells of any given APC population<sup>31</sup> (Figure. 3-1). Also, despite the fact that most lip35-expressing B cells appear to mature properly, there is a clear reduction in the number of spleen follicular mature B cells.<sup>31</sup> These phenotypic characteristics may seriously hinder the presentation of the immunogen to T cells, thereby curtailing the B cell response.

In conclusion, our results using the Tgp35/mliKO mice have revealed that the human lip35 is functional in diversifying the peptide repertoire associated to MHC II molecules. Accordingly, it allowed the presentation of a T cell epitope that is known to be strictly dependent on the expression of li.<sup>8,33</sup> These mice should be useful in the future to investigate the role of lip35 in the intracellular trafficking of MHC II molecules as well as in other functions such as signal transduction and the regulation of cell motility. These aspects are particularly interesting in the context where they rely on the cytoplasmic tail of li, which is peculiar in the lip35 isoform.

### 3.7. Methods

#### Mice

The lip35 transgenic mice have been described previously.<sup>31</sup> Briefly, the li cDNA was mutated on the second methionine codon to prevent translation of the lip33 isoform. Transgenic mice were then bred with either C57BL/6 or C57BL/6-mliKO mice to obtain

transgenic mice expressing lip35 alone (Tgp35/mliKO) or in addition to the endogenous li (Tgp35). All the experiments were done in accordance with Canadian council of animal care.

### **Antibodies**

BU45 is mouse IgG1 antibody specific to the C-terminal part of human li. It was purified and coupled to Alexa-647 (Invitrogen, San Diego, CA, USA). In-1 is a rat IgG<sub>2b</sub> specific for the N-terminal part of murine li (BD-Pharmingen, Mississauga, CA, USA) and was coupled to Alexa-647. The CD8-PercP, CD45.2-biotin and mouse-FITC-V $\beta$  panel antibodies were purchased from BD Pharmingen, while  $\alpha$ -I-A<sup>b</sup> (28-16-8S) antibody was purchased from Caltag (San Diego, CA, USA). Antibodies against I-A<sup>b</sup> (AF6-120.1) and CD11b-biotin were purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA) while anti-CD4-PE, and CD3-FITC were purchased from Cedarlane (Burlington, CA, USA). The secondary antibodies streptavidine-PE was purchased from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA). The PBS-57  $\alpha$ GalCer-loaded CD1d-tetramers-PE was obtained from the NIH Tetramer Core Facility (Atlanta, GA, USA).

### **Flow Cytometry**

Single cell suspensions were obtained by organs dissociation. Red blood cells were lysed (for spleen and BM) by 5 min incubation in 0,83% NH<sub>4</sub>Cl. Cells ( $10^6$ ) were resuspended in PBS, FBS 3%, Hepes 10mM and stained on cell surface for 30 min on ice. For total stainings, cells were first incubated 10 min in PBS/FBS/Hepes containing 0,1% saponin. Cells were analyzed on a FACSCalibur® flow cytometer (Becton Dickinson, Mississauga, Ontario, Canada).

### **Peritoneal macrophages preparation**

Mice were sacrificed and peritoneal cavity was washed with 15mL of cold PBS, FBS 3%. Harvested cells were either directly used for flow cytometry analysis or incubated in complete RPMI containing 100U/mL of IFN- $\gamma$  (BD Pharmingen) at 37°C during 48h. Cells were then harvested and stained.

### **Thymic epithelial cells (TEC) isolation**

Isolated thymus were superficially cut and incubated in RPMI without FBS under agitation at 4°C during 30min. Thymus were then digested twice with RPMI, collagenase D 0,125%, DNase I 0,1% during 20min. Digested cells were harvested and remaining thymus was dissociated using syringe and needle. Cells were centrifuged 10 min at 200g at 4°C and resuspended in PBS, FBS3%, Hepes 10mM, EDTA 5mM and incubated 10min at 4°C. Suspension was filtered on a 0.70 $\mu$ m filter and centrifuged 10min at 200g at 4°C. Pellet was resuspended in 4mL of 1,115g/mL Percoll solution and transferred in a FBS enrobed tube. On top, 2mL of the 1,065g/mL Percoll solution were added, then 2mL of PBS. The gradient tube was centrifuged 30 min at 1290g at 4°C. TEC cells were harvested from interface between PBS and 1,065g/mL solution then washed two times in complete media and stained.

### **Invariant NK T cells staining**

Thymocytes were incubated with  $\alpha$ GalCer-loaded CD1d-tetramers (or unloaded control) during 15min at 37°C and washed three times. Cells were then stained with anti-CD3 antibody during 30min at 4°C and washed three times. One million cells were acquired on FACS.

### Bone marrow-derived macrophages

Bone marrow cells were incubated 2h at 37°C in non-treated plastic dishes in order to eliminate the contaminating fibroblasts. Non adherent cells were transferred on tissue-culture treated dishes and cultivated for 6 days in complete medium supplemented with 10 % of conditioned culture medium from the L929 cell line. Then, the adherent cells were removed with PBS-EDTA 1mM and cultivated in 24-well plates ( $3.10^5$  cells / well) in complete medium containing 100 U/ml of IFN- $\gamma$  for 16h before the antigen presentation assay (see below).

### Antigen presentation assay

Latex beads (0.8 $\mu$ m; MERCK, Kirkland, CA, USA) were washed with PBS and incubated in 10mg/mL of either OVA (Sigma, Oakville, CA, USA) or BSA overnight at 4°C under agitation then washed three times with PBS. OVA-coated beads were then incubated with 10 $\mu$ g/mL of rabbit anti-OVA antibody at 4°C for 1h before washing in cold PBS. Bone marrow-derived macrophages, prepared as described above, were incubated with antigen-coupled beads for 1h at 37°C and chased for 3h30. Then,  $4 \times 10^5$  cells/well of OVA<sub>323-339</sub>-specific, I-A<sup>b</sup>-restricted B097.10 hybridoma (a kind gift from Dr. P. Marrack) were added and co-cultured overnight at 37°C. Secreted IL-2 was quantified by ELISA (eBioscience, San Diego, CA, USA).

### 3.8. Acknowledgements

We would like to thank M. Serge Sénéchal for helping with flow cytometry. Special thanks to Dr Miriam Marquis for helping with the isolation of TECs. We are grateful to O. Bakke, A. and P. Cresswell for kindly providing antibodies as well as P. Marrack for the B097.10 hybridoma. This research was funded by the National Science and Engineering

Research Council of Canada (NSERC) (grant number 298537). L.G. was supported in part by a studentship from INSERM (U-743).

### 3.9. References

- 1 Stumptner-Cuvelette P, Benaroch P. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; **1542**: 1-13.
- 2 Pieters J, Bakke O, Dobberstein B. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell Sci.* 1993; **106** ( Pt 3): 831-46.
- 3 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**: 317-30.
- 4 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**: 474-7.
- 5 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.
- 6 Sloan VS, Cameron P, Porter G et al. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA- DR. *Nature* 1995; **375**: 802-6.
- 7 Koch N, Lauer W, Habicht J, Dobberstein B. Primary structure of the gene for the murine Ia antigen-associated invariant chains (Ii). An alternatively spliced exon encodes a cysteine-rich domain highly homologous to a repetitive sequence of thyroglobulin. *EMBO J.* 1987; **6**: 1677-83.
- 8 Viville S, Neefjes JJ, Lotteau V et al. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 1993; **72**: 635-48.
- 9 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**: 1699-712.
- 10 Elliott EA, Drake JR, Amigorena S et al. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 1994; **179**: 681-94.
- 11 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**: 409-16.
- 12 Sadegh-Nasseri S, Germain RN. How MHC class II molecules work: peptide-dependant completion of protein folding. *Immunol. Today* 1992; **13**: 43-6.
- 13 Bodmer H, Viville S, Benoist C, Mathis D. Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by invariant chain. *Science* 1994; **263**: 1284-6.

- 14 Tourne S, Nakano N, Viville S, Benoist C, Mathis D. The influence of invariant chain on the positive selection of single T cell receptor specificities. *Eur. J. Immunol.* 1995; **25**: 1851-6.
- 15 Wong P, Rudensky AY. Phenotype and function of CD4<sup>+</sup> T cells in mice lacking invariant chain. *J. Immunol.* 1996; **156**: 2133-42.
- 16 Naujokas MF, Arneson LS, Fineschi B et al. Potent effects of low levels of MHC class II-associated invariant chain on CD4+ T cell development. *Immunity*. 1995; **3**: 359-72.
- 17 Shachar I, Elliott EA, Chasnoff B, Grewal IS, Flavell RA. Reconstitution of invariant chain function in transgenic mice in vivo by individual p31 and p41 isoforms. *Immunity* 1995; **3**: 373-83.
- 18 Huang LY, van Meerwijk JP, Bikoff EK, Germain RN. Comparison of thymocyte development in normal and invariant chain-deficient mice provides evidence that maturation-related changes in TCR and co-receptor levels play a critical role in cell fate. *Int. Immunol.* 1996; **8**: 1429-40.
- 19 Sille FC, Martin C, Jayaraman P et al. Critical role for invariant chain in CD1d-mediated selection and maturation of Valpha14-invariant NKT cells. *Immunol. Lett.* 2011; **139**: 33-41.
- 20 Strubin M, Berte C, Mach B. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 1986; **5**: 3485-8.
- 21 O'Sullivan DM, Noonan D, Quaranta V. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J. Exp. Med.* 1987; **166**: 444-50.
- 22 Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 1991; **354**: 392-4.
- 23 Lamb CA, Cresswell P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J. Immunol.* 1992; **148**: 3478-82.
- 24 Anderson HA, Bergstrahl DT, Kawamura T, Blauvelt A, Roche PA. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J. Immunol.* 1999; **163**: 5435-43.
- 25 Newcomb JR, Cresswell P. Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J. Immunol.* 1993; **151**: 4153-63.
- 26 Schutze M-P, Peterson PA, Jackson MR. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 1994; **13**: 1696-705.
- 27 Kuwana T, Peterson PA, Karlsson L. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998; **95**: 1056-61.
- 28 Anderson HA, Roche PA. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J. Immunol.* 1998; **160**: 4850-8.
- 29 Khalil H, Brunet A, Saba I, Terra R, Sekaly RP, Thibodeau J. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int. Immunol.* 2003; **15**: 1249-63.

- 30 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**: 839-55.
- 31 Geneve L, Menard C, Labrecque N, Thibodeau J. The p35 human invariant chain in transgenic mice restores mature B cells in the absence of endogenous CD74. *Int. Immunol.* 2012; **24**: 645-60.
- 32 van Santen H, Benoist C, Mathis D. A cassette vector for high-level reporter expression driven by a hybrid invariant chain promoter in transgenic mice. *J. Immunol. Methods* 2000; **245**: 133-7.
- 33 Serwe M, Reuter G, Sponaas A, Koch S, Koch N. Both invariant chain isoforms li31 and li41 promote class II antigen presentation. *Int. Immunol.* 1997; **9**: 983-91.
- 34 Steimle V, Siegrist C-A, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994; **265**: 106-9.
- 35 Landsverk OJ, Bakke O, Gregers TF. MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain. *Scand. J. Immunol.* 2009; **70**: 184-93.
- 36 Khalil H, Brunet A, Thibodeau J. A three-amino-acid-long HLA-DRbeta cytoplasmic tail is sufficient to overcome ER retention of invariant-chain p35. *J. Cell Sci.* 2005; **118**: 4679-87.
- 37 Warmerdam PA, Long EO, Roche PA. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J. Cell Biol.* 1996; **133**: 281-91.
- 38 Kuwana T, Peterson PA, Karlsson L. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998; **95**: 1056-61.
- 39 Miyazaki T, Wolf P, Tourne S *et al.* Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 1996; **84**: 531-41.
- 40 Ignatowicz L, Kappler J, Marrack P. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 1996; **84**: 521-9.
- 41 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**: 543-50.
- 42 Tourne S, Miyazaki T, Oxenius A *et al.* Selection of a broad repertoire of CD4+ T cells in H-2Ma<sup>0/0</sup> mice. *Immunity*. 1997; **7**: 187-95.
- 43 Lee BK, Eicher EM. Segregation patterns of endogenous mouse mammary tumor viruses in five recombinant inbred strain sets. *J. Virol.* 1990; **64**: 4568-72.
- 44 Woodland D, Happ MP, Bill J, Palmer E. Requirement for cotolerogenic gene products in the clonal deletion of I-E reactive T cells. *Science* 1990; **247**: 964-7.
- 45 Tomonari K, Fairchild S, Rosenwasser OA. Influence of viral superantigens on V $\beta$ - and V $\alpha$ -specific positive and negative selection. *Immunol. Rev.* 1993; **131**: 131-68.
- 46 Simpson E, Dyson PJ, Knight AM, Robinson PJ, Elliott JI, Altmann DM. T-cell receptor repertoire selection by mouse mammary tumor viruses and MHC molecules. *Immunol. Rev.* 1993; **131**: 93-115.

- 47 Wei DG, Lee H, Park SH *et al.* Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* 2005; **202**: 239-48.
- 48 Sullivan BA, Nagarajan NA, Kronenberg M. CD1 and MHC II find different means to the same end. *Trends Immunol.* 2005; **26**: 282-8.
- 49 Jayawardena-Wolf J, Benlagha K, Chiu YH, Mehr R, Bendelac A. CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity*. 2001; **15**: 897-908.
- 50 Gelin C, Sloma I, Charron D, Mooney N. Regulation of MHC II and CD1 antigen presentation: from ubiquity to security. *J. Leukoc. Biol.* 2009; **85**: 215-24.

### 3.10. Figure legends

**Figure 3-1 : lip35 is expressed in APCs.**

Cells were stained for different markers prior to permeabilisation and staining with BU45 or In-1. Percentages of cells expressing li are indicated. (a) Peritoneal cavity was washed with cold PBS and cells were collected. After a 48h incubation period in the presence of 100U per mL of IFN- $\gamma$ , cells were stained with an anti-CD11b mAb and with BU45 or In-1. (b) TECs were extracted from thymus by digestion with collagenase D, isolated on a percoll gradient and stained for I-A<sup>b</sup> (28-16-8S), CD45.2 and BU45 or In-1. (c,d) Thymocytes were stained with BU45 or In-1, anti-CD3, -CD4 and -CD8. Cells were gated on CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells (c) or CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells (d). Data are representative of three independent experiments.

**Figure 3-2 : lip35 restores thymic selection.**

Thymocytes (**a**) or splenocytes (**b**) were stained with anti-CD4 and -CD8 mAbs. Percentages of CD4<sup>+</sup> and/or CD8<sup>+</sup> T cells are indicated on the corresponding gates. (**c**) TECs (CD45.2<sup>-</sup> and I-A<sup>b+</sup>) were isolated and stained for I-A<sup>b</sup> and lip35 or the endogenous mli. MFV represents the mean fluorescence values on gated cells. Data are representative of three independent experiments. (**d**) Cells from lymph nodes were stained with anti-CD4

and various antibodies specific for the various V $\beta$  portions of the TCR. Stainings were performed on three mice per group.

**Figure 3-3 : Normal levels of TCR on CD4 $^{+}$  T cells from Tg mice.**

Thymocytes (**a**) or splenocytes (**b**) were stained for expression of CD3, CD4 and CD8. Cells were gated on CD4 $^{+}$  T cells (left panels) or CD8 $^{+}$  T cells (right panels). The mean fluorescence values of CD3 expression were: **a**, (CD4 $^{+}$ ) WT: 239; mliKO: 156; Tgp35/mliKO: 231; Tgp35: 239. (CD8 $^{+}$ ) WT: 168; mliKO: 188; Tgp35/mliKO: 172; Tgp35: 175. **b**, (CD4 $^{+}$ ) WT: 157; mliKO: 76; Tgp35/mliKO: 151; Tgp35: 165. (CD8 $^{+}$ ) WT: 110; mliKO: 109; Tgp35/mliKO: 111; Tgp35: 115.

**c**, Lymph node cells were stained with anti-CD4, -CD8 and various V $\beta$ -specific antibodies. Graphs represent the mean fluorescence values of the TCR V $\beta$  expression on CD4 $^{+}$  or CD8 $^{+}$  gated T cells. Data are representative of three independent experiments.

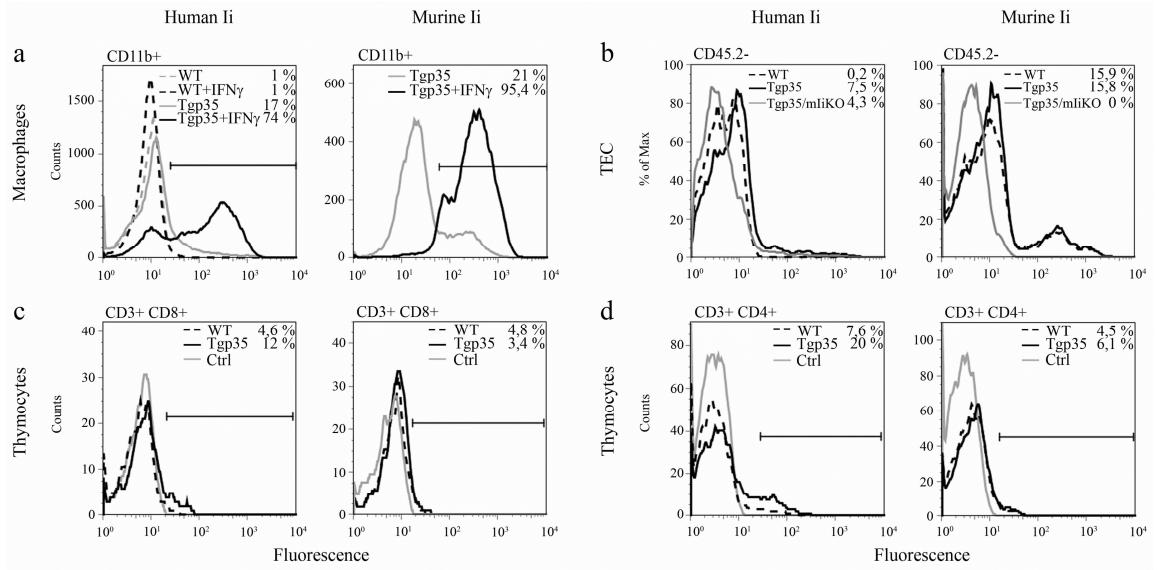
**Figure 3-4 : lip35 restores the iNKT cells selection.**

Thymocytes were stained on cell surface with the  $\alpha$ GalCer-loaded CD1d-tetramer at 37°C then with anti-CD3 at 4°C. Percentage of iNKT cells is indicated on the gate. Data are representative of three independent experiments.

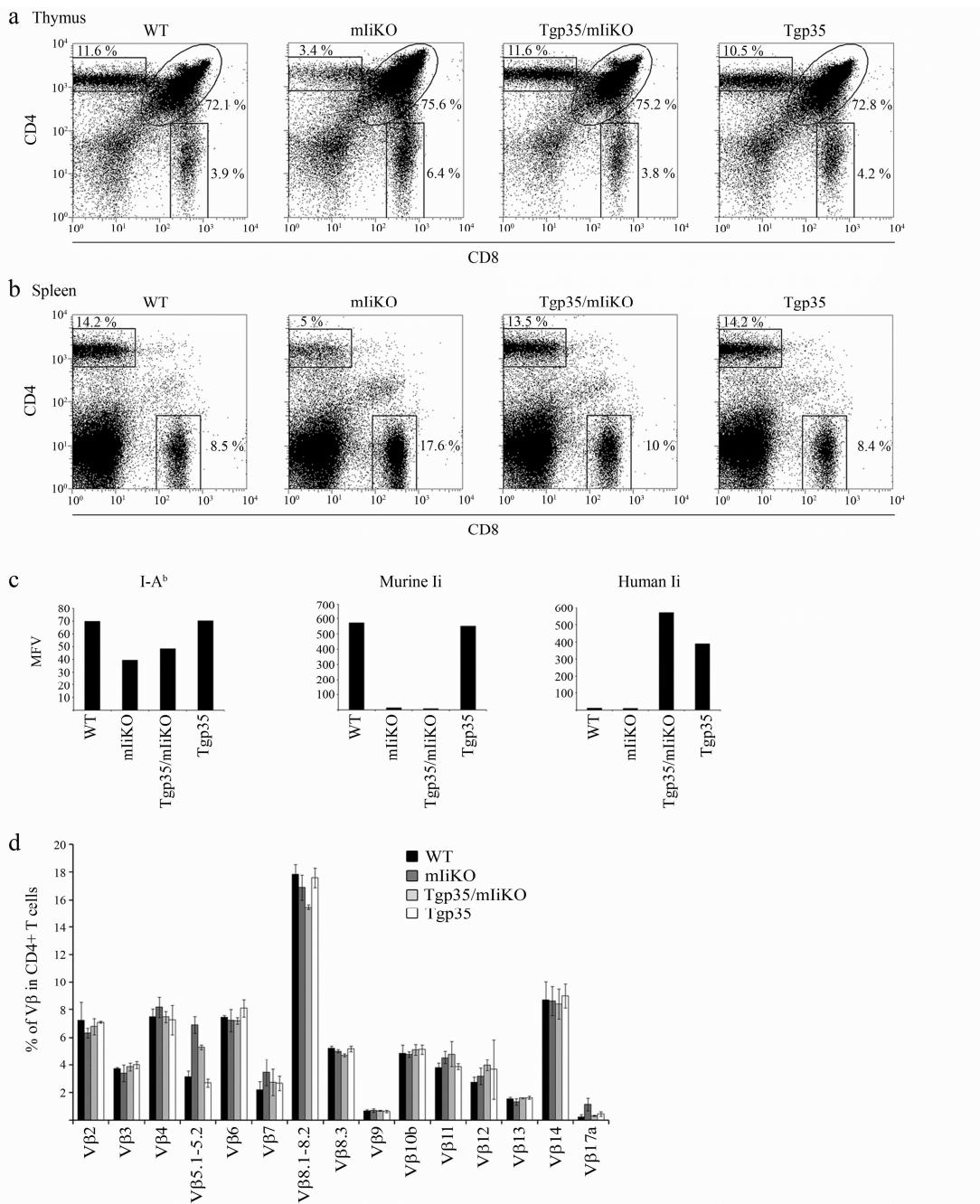
**Figure 3-5 : OVA presentation in the context of lip35.**

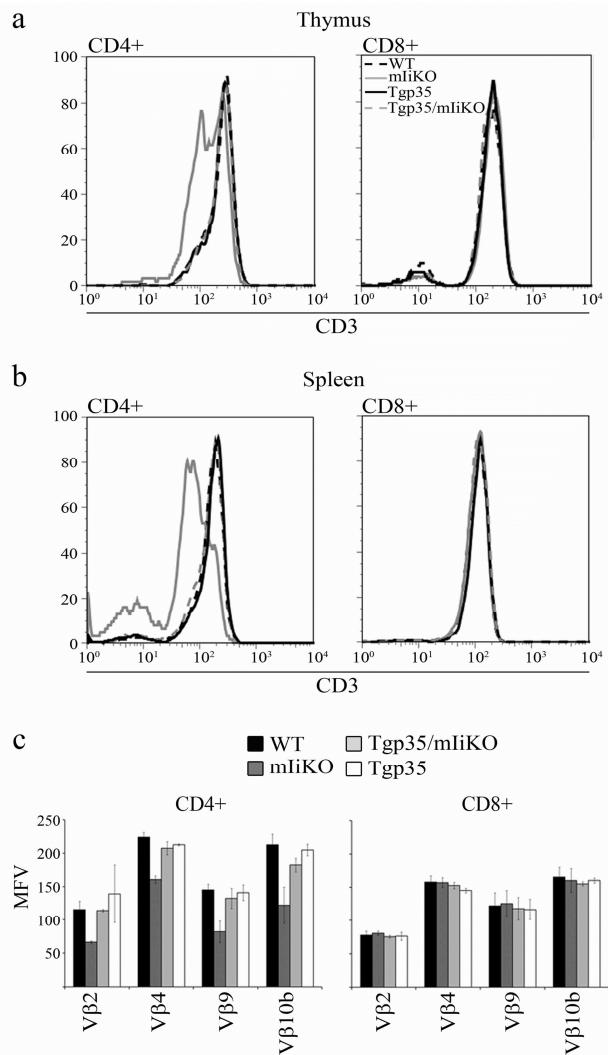
Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were incubated with IFN- $\gamma$  for 16h before flow cytometry analyses and *in vitro* antigen presentation assays. **(a)** Cells were stained for cell surface I-A $^b$  (AF6-120.1) before membrane permeabilization and staining for lip35 (BU45) or mli (In-1). I-A $^{+}$  cells were gated and the mean fluorescence values were plotted. **(b)** Cells were pulsed with OVA- or BSA-coupled beads for 1h and chased for 3h30 before co-culture with the B097.10 T cell hybridoma. After 16h, IL-2 released in the media was quantified by ELISA. Data are representative of three independent experiments.

### 3.11. Figures

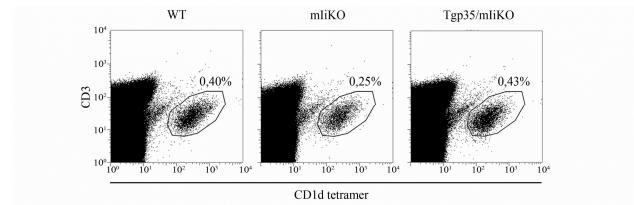


**Figure 3-1 : lip35 is expressed in APCs.**

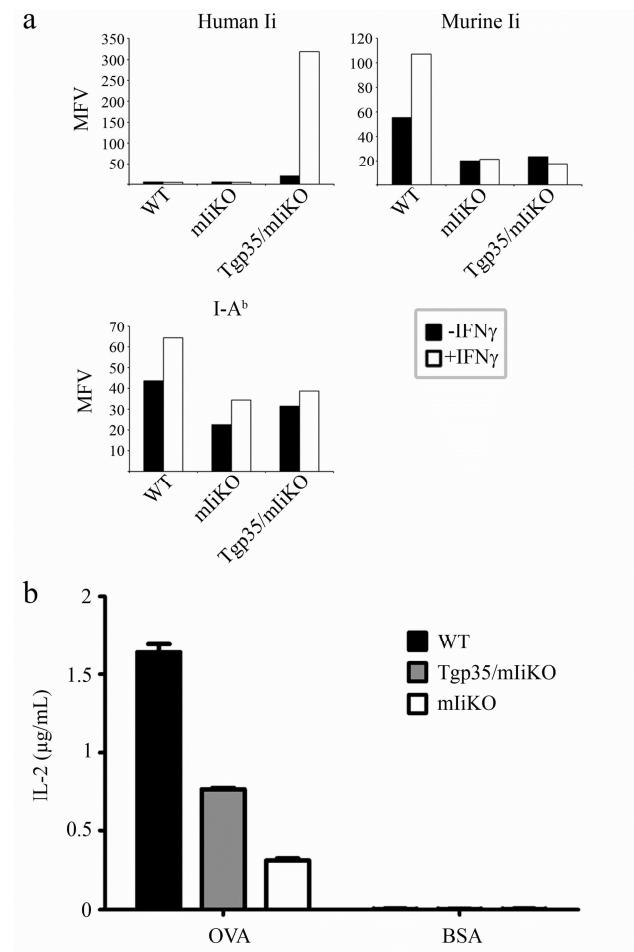
**Figure 3-2 : lip35 restores thymic selection.**



**Figure 3-3 : Normal levels of TCR on CD4<sup>+</sup> T cells from Tg mice.**



**Figure 3-4 : lip35 restores the iNKT cells selection.**



**Figure 3-5 : OVA presentation in the context of lip35.**

# Chapitre 4. Discussion

---

La chaîne invariante (Ii ; CD74) est une protéine pléiotropique qui a un impact majeur dans le transport du CMH II et la présentation antigénique et qui permet la sélection thymique des cellules T CD4+.<sup>251, 252</sup> Elle favorise également la présentation des lipides par les molécules CD1d et la sélection subséquente des cellules iNKT.<sup>179</sup> Enfin, indépendamment de son rôle sur le CMH II, elle induit le développement des cellules B.<sup>374,</sup>  
<sup>390</sup> La chaîne invariante a donc un rôle primordial sur le CMH II et l'immunité. L'isoforme humaine lip35 est particulière par son motif de rétention dans le RE qui a un effet dominant sur le trafic des autres isoformes d'Ii contenues dans des trimères mixtes.<sup>205, 330,</sup>  
<sup>445</sup> Contrairement à lip33, elle est internalisée très rapidement et ne s'accumule donc pas en surface.<sup>194, 283</sup> Enfin, son expression est anormale dans des pathologies telles que le diabète ou les cancers.<sup>452, 454</sup> Cependant, le rôle physiologique du motif R-x-R de rétention et le rôle particulier de l'isoforme lip35 demeurent nébuleux. Afin d'élucider le rôle d'lip35 dans les diverses fonctions connues de la chaîne invariante, nous avons généré des souris transgéniques exprimant cette isoforme. Les principaux résultats obtenus sont discutés ici.

## 4.1. Génération et caractérisation des souris Tg exprimant lip35

Nous avons produit par transgénèse, trois souris fondatrices différentes qui expriment lip35 (Tgp35). Ces souris ont été croisées avec des souris déficientes pour la chaîne invariante endogène (mliKO)<sup>251, 252</sup> afin d'obtenir des souris exprimant lip35 comme seule source de chaîne invariante (Tgp35/mliKO). Les souris WT expriment uniquement la chaîne invariante murine et servent de contrôle. Nos souris sont des C57BL/6 ayant l'haplotype H2<sup>b</sup>. Les expériences ont été réalisées sur les descendants des différentes souris fondatrices et ont abouti aux mêmes résultats. Ceci permet d'être certain que le phénotype observé chez les souris Tg est bien dû à lip35 et non à la

localisation du transgène dans le génome de la souris puisqu'il ne s'est certainement pas inséré aux mêmes endroits chez les différentes souris fondatrices.

Nous avons tout d'abord caractérisé notre modèle afin de vérifier que l'isoforme humaine lip35 de la chaîne invariante est exprimée de manière similaire à son homologue murine. Nous avons démontré qu'lip35 est exprimé dans les TEC et les APC et que son expression est fortement induite par l'FN $\gamma$  (Figure 2-1 et Figure 3-1). Cependant, pour chaque population d'APC, son expression est cantonnée à une partie des cellules seulement, alors qu'li murin est exprimé dans toutes les cellules de la population. Un des problèmes de notre modèle Tg est que nous ne disposons pas du contrôle de souris exprimant lip33 pour la comparaison avec lip35. Cependant, Honey et ses collègues ont générée des souris Tg exprimant principalement l'isoforme humaine lip33.<sup>455</sup> Ces souris présentent un phénotype sauvage ce qui démontre qu'lip33 est fonctionnel chez ces souris et que les molécules lip31 et lip33 sont interchangeables. Mais, pour certains résultats obtenus avec nos souris Tgp35/mliKO, comme l'absence de restauration de l'expression de DM (Figure 2-11), on ne peut pas savoir si lip35 en particulier n'interagit pas avec DM ou si c'est le cas de toutes les isoformes humaines en présence de DM murin. Pour pallier à ce problème, nous aurions pu, au lieu d'insérer lip35 chez la souris, ajouter l'extension de la queue cytoplasmique de 16 acides aminés d'lip35 sur la queue d'lip31 puis procéder à une transgénèse. Alternativement, nous aurions pu utiliser cette construction chimérique lip31/lip35 et l'insérer par knock-in chez les souris afin de remplacer le li murin par cette molécule chimérique d'li. Ainsi, on aurait pu imputer à la queue cytoplasmique d'lip35 les résultats observés et exclure, par exemple, une mauvaise interaction d'li humain avec des protéines murines. Cependant, pour les autres résultats obtenus, tels que le changement de conformation du CMH II, le développement des cellules B et T, on peut sans conteste établir qu'ils sont dus à lip35 lui-même.

Ensuite, nous avons démontré qu'il existe des trimères mixtes formés des protéines mli et lip35 dans nos souris Tgp35 (Figure 2-2). Cependant, il est possible que la

formation de trimères mixtes soit défavorisée par rapport à la formation de trimères contenant uniquement des formes murines ou uniquement lip35. Malheureusement, il n'existe pas d'anticorps permettant de distinguer un trimère mixte d'un trimère contenant uniquement mli. Par ailleurs, nous avons observé qu'il y a plus de cellules exprimant lip35 chez les souris Tgp35/mliKO que chez les souris Tgp35 ce qui suggère qu'il y aurait un développement préférentiel des cellules exprimant mli par rapport à celles exprimant lip35. Alternativement, il est possible que l'expression des deux chaînes invariantes soit délétère pour les cellules. En absence de mli, les cellules exprimant lip35 pourraient se développer plus facilement. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences de souris chimériques. Pour cela, les souris mliKO irradiées recevraient des cellules exprimant lip35 ou mli ou les deux ensemble. Le suivi des cellules injectées pourra déterminer s'il y a un développement préférentiel des cellules exprimant mli au détriment de celles exprimant lip35 ou si le défaut de développement est intrinsèque à lip35.

Afin d'observer plus finement la localisation intracellulaire de la chaîne invariante lip35 chez les souris Tgp35/mliKO, il pourrait être intéressant de réaliser des expériences de microscopie confocale. En marquant lip35 et mli ainsi que différents compartiments cellulaires, il serait possible de visualiser l'expression de surface ainsi que la rétention dans le RE et la répartition intracellulaire des molécules lip35 et mli. Par exemple, le RE peut être visualisé grâce aux anticorps anti-PDI, -Calnexine ou -BiP et les lysosomes grâce aux anti-Lamp1, -Lamp2, ou -Rab7. Ceci permettrait aussi de déterminer avec précision si les deux chaînes invariantes sont co-localisées dans les mêmes compartiments intracellulaires. Cette expérience a été réalisée au laboratoire sans conduire à des résultats concluants à cause de la difficulté à réaliser des colorations claires sur des cellules primaires, en particulier des splénocytes. Alternativement, la localisation d'lip35 pourrait être détectée en utilisant la microscopie électronique.

## 4.2. Le rôle d'lip35 sur la conformation et le trafic intracellulaire du CMH II

La chaîne invariante joue un rôle important sur la conformation et le transport du CMH II. En effet, chez les souris mliKO, le CMH II forme des agrégats dans le RE et la plupart des chaînes  $\beta$  restent au stade immature, c'est-à-dire sous forme de molécules non glycosylées qui n'ont pas atteint le Golgi.<sup>240, 251, 252, 344</sup> De plus, le CMH II présente une expression réduite en surface et possède une conformation relâchée caractéristique des molécules vides ou liées faiblement à des peptides.<sup>240, 251, 252, 258, 456, 457</sup>

Nos résultats ont démontré qu'lip35, malgré la présence de mli, induit quelques formes immatures de la chaîne  $\beta$  du CMH II et la formation d'agrégats (Figure 2-3), ce qui suggère que quelques CMH II sont piégés par lip35 dans le RE. Cependant, comme l'expression en surface du CMH II chez les souris Tgp35 n'est pas affectée par lip35 (Figure 2-4), c'est sûrement une faible proportion de la quantité totale du CMH II qui est retenue. La détection d'intermédiaires de dégradation d'Ii et de complexes CLIP-CMH II (Figure 2-2) démontre que le motif de rétention d'lip35 est masqué par I-A<sup>b</sup> et qu'lip35 migre jusqu'aux endosomes dans lequel il est correctement dégradé par les protéases murines. De plus, on a observé qu'lip35 induit une conformation compacte du CMH II et réduit la liaison de peptide exogène sur ce dernier (Figure 2-3). Enfin, lip35 rétablit l'expression de surface du CMH II de manière dépendante de la dose (Figure 2-4). Ces résultats démontrent qu'lip35 a transporté le CMH II, d'abord dans les endosomes où il y a eu échange du CLIP pour un peptide de forte affinité, puis vers la surface.

Nous avons aussi démontré qu'en absence d'Ii, le CMH II adopte une conformation différente détectée par le nouvel anticorps AF6-120.1 qui reconnaît un épitope conformationnel sur la chaîne  $\beta$  du CMH II (Figure 2-5).<sup>458</sup> Le fort signal AF6-120.1 détecté correspond à un changement de conformation de la protéine native du CMH II et non à une augmentation de la quantité de molécules ni à la reconnaissance d'un produit de dégradation du CMH II (Figure 2-5 et Figure 2-6). Ainsi, dans les souris mliKO, le CMH II adopte une conformation particulière qui est reconnue spécifiquement par AF6-120.1.

Quant à lip35, il exacerbe le phénomène en augmentant ce type conformation du CMH II, et ce, même en présence d'li murin (Figure 2-6).

Tous ces résultats démontrent qu'lip35 induit un changement de conformation du CMH II qui devient réceptif à l'anticorps AF6-120.1 et qui forme des complexes compacts réfractaires à la liaison de peptides exogènes.

#### **4.3. La rétention d'lip35 dans le RE dans une population de cellules B**

Nous avons observé, dans les cellules B de la rate et de la moelle, qu'en présence d'lip35, il y avait une augmentation de l'expression totale d'li murin (Figure 2-1 et Figure 2-7). Ces résultats pourraient être la conséquence d'une compétition entre les deux li pour la liaison au CMH II, ce qui causerait l'accumulation dans le RE de quelques molécules d'li murin qui ne pourraient donc pas être dégradées. Ceci concorde avec le nombre accru de complexes CLIP-CMH II observés chez les souris Tgp35/mliKO par rapport aux souris Tgp35 (Figure 2-2). Dans ces dernières, lip35 et mli sont en compétition pour la liaison à I-A<sup>b</sup> donc il y a moins de molécules lip35 transportées dans les endosomes et donc moins de CLIP généré. De plus, on a détecté des populations de cellules B dans lesquelles lip35 ne semble pas être fonctionnel. On avait vu, précédemment, que dans les cellules de souris Tgp35, lip35 induisait des formes immatures et des agrégats du CMH II même en présence d'li murin ce qui veut dire qu'lip35 retient quelques CMH II dans le RE (voir section 4.2 ci-dessus et Figure 2-3). Nous avons aussi observé, dans les cellules B de la moelle, qu'en dépit de l'expression simultanée de mli et lip35 dans les souris Tgp35, lip35 agit comme un dominant négatif et réduit l'expression du CMH II en surface par rapport aux souris WT (Figure 2-7). Cette population de cellules n'assure apparemment pas la sortie du RE d'lip35 causant la rétention du CMH II dans ce compartiment. Ceci concorde avec l'augmentation de l'expression d'li murin dans ces mêmes cellules de

moelle (Figure 2-7). Les mêmes observations ont été faites dans la rate (Figure 2-4 et Figure 2-8).

Cependant, la nature de cette population qui n'assure pas la sortie du RE d'lip35 de même que le mécanisme causant cette rétention demeurent nébuleux et méritent d'être éclaircis grâce à des expériences supplémentaires. Tout d'abord, il faudrait déterminer la nature de cette population de cellules B. Pour cela, il faudrait réaliser des marquages en utilisant des marqueurs additionnels de ceux utilisés, tels que CD23, CD25, CD43, Flt3 ou CD24 afin de pouvoir discriminer précisément les différents stades de maturation dans la rate.<sup>383</sup> Ensuite, ces cellules devraient être marquées pour le CMH II en surface et pour l'expression d'lip35. Ceci pourrait nous permettre d'évaluer quelle sous-population n'assure pas la sortie du RE d'lip35 et n'augmente pas le CMH II en surface. Une fois la population identifiée, il faudrait déterminer la cause de la rétention d'lip35 dans le RE. L'explication la plus logique est qu'lip35 n'est pas phosphorylé dans ces cellules.<sup>449, 450</sup> Pour tester ceci, il faudrait isoler les cellules B d'intérêt et quantifier, soit par immunoprécipitation et western blot, soit par ELISA, la phosphorylation des séries d'lip35 en comparant avec un contrôle de cellules B exprimant fortement le CMH II en surface.<sup>270, 374</sup> Il n'existe pas d'anticorps spécifique des séries de la queue cytoplasmique d'lip35, cependant, la phosphorylation globale de la protéine lip35 correspond à celle des deux séries. En effet, les précédentes études étudiant la phosphorylation d'lip35 ont montré que lorsque les deux séries de la queue cytoplasmique sont mutées, aucune phosphorylation d'lip35 n'est détectée.<sup>450</sup> Pour essayer d'augmenter la sortie du RE d'lip35, on pourrait ensuite stimuler des splénocytes, *in vitro*, avec de la PMA. Cette drogue stimule l'activité de la PKC et augmente donc la phosphorylation d'lip35 ainsi que sa sortie du RE.<sup>201, 459</sup> Le CMH II en surface serait ensuite mesuré pour évaluer si la phosphorylation d'lip35 a permis d'accroître le taux de sortie du RE. Un marquage des cellules B pourrait déterminer si l'augmentation de la sortie du RE rétablit la maturation des cellules. Par ailleurs, on pourrait également introduire, dans les différentes

populations de cellules B, des protéines lip35 ayant des mutations au niveau des deux séries les empêchant d'être phosphorylées, et observer la rétention dans le RE d'lip35. Si la phosphorylation déficiente d'lip35 dans ces cellules est bien la cause du défaut de maturation, il faudrait déterminer si ceci est dû à une réduction de l'expression et de l'activation des PKC dans ces cellules.

Il a aussi été démontré qu'lip35 phosphorylé interagissait avec la protéine 14-3-3, ce qui favorisait la sortie du RE. Il est possible qu'une interaction sous-optimale entre lip35 et 14-3-3 résulte en une rétention accrue d'lip35 dans le RE.<sup>450, 460</sup> L'expression de 14-3-3 murin pourrait être évaluée par western blot et l'association entre lip35 et 14-3-3 observée grâce à une immunoprecipitation d'lip35 suivie d'un blot avec un anticorps dirigé contre 14-3-3.<sup>450</sup>

Toutes ces expériences pourraient nous informer, à la fois sur la nature de la population de cellules B qui présente une rétention d'lip35, mais aussi sur la cause de cette rétention.

#### **4.4. Le rôle d'lip35 dans le développement des cellules B**

Les souris déficientes en chaîne invariante ont un défaut de maturation des cellules B qui se traduit par une augmentation du nombre de cellules immatures (T1) et une réduction de cellules folliculaires matures (FO). La proportion de cellules de la zone marginale (MZ) est également accrue.<sup>344, 387, 403</sup>

Comme attendu, nos résultats démontrent que les souris mliKO ont une réduction du pourcentage de cellules FO ainsi qu'une augmentation de celui des cellules T1 et MZ. Chez les souris Tg, le développement des cellules B a été observé en fonction du niveau d'expression d'lip35. Parmi les cellules qui expriment de forts niveaux d'lip35 ( $\text{lip35}^{\text{high}}$ ), on observe une augmentation de la proportion de T1 et une réduction de cellules FO (Figure 2-9 et Figure 2-12) démontrant que ces cellules ne se développent pas

correctement et qu'il y a une accumulation de cellules immatures. Inversement, chez les cellules  $\text{lip35}^{\text{int}}$ , la proportion de cellules FO est identique à celle des souris WT ce qui démontre qu' $\text{lip35}$ , exprimé à des niveaux moyens, assure le développement des cellules FO. Par contre, on observe très peu de cellules MZ exprimant  $\text{lip35}$ , quel que soit le niveau d'expression de ce dernier (Figure 2-9 et Figure 2-12). Ces résultats démontrent deux choses. Premièrement,  $\text{lip35}$  exprimé à des niveaux moyens, est capable d'assurer la maturation des cellules B alors que des forts niveaux d'expression sont néfastes pour les cellules. Deuxièmement, le développement des cellules B en cellules FO ou MZ est le résultat de deux processus indépendants l'un de l'autre puisqu'on observe peu de cellules MZ, indépendamment de la proportion de FO ou du niveau d'expression d' $\text{lip35}$ . En effet, des niveaux intermédiaires d' $\text{lip35}$  permettent le développement en cellules FO mais pas en cellules MZ, ce qui démontre que le processus de développement est différent pour ces deux populations. De plus, celles-ci sont issues des précurseurs T2, mais leur développement n'est pas dépendant l'un de l'autre. En effet, pour les cellules  $\text{lip35}^{\text{high}}$ , malgré la diminution du nombre de cellules FO, on n'observe pas d'augmentation du nombre de cellules MZ ce qui démontre qu'il n'y a pas développement d'une population au détriment de l'autre. Ainsi, le processus de développement des cellules FO et des cellules MZ est différent et indépendant l'un de l'autre.

Afin d'affiner l'évaluation de la maturation des cellules B, il serait intéressant d'observer quelles sont les proportions de cellules dans les ganglions lymphatiques, puisque chez les souris mliKO, la réduction de cellules matures est dramatique.<sup>387, 389, 403</sup> De plus, il serait intéressant de déterminer les proportions des cellules B1, caractérisées par un phénotype  $\text{IgM}^{\text{high}} \text{ IgD}^{\text{low}} \text{ CD43+ CD23- B220}^{\text{low}}$ ,<sup>461</sup> et de voir si  $\text{lip35}$  a un effet sur le développement de cette lignée. Benlagha et al, ont observé seulement une légère diminution de cellules B1 chez les souris mliKO.<sup>403</sup> Cependant,  $\text{lip35}$  pourrait avoir un effet sur le développement de ces cellules, comme il a un impact sur le compartiment des cellules MZ, indépendamment du développement des autres sous-types de cellules B.

Nous avons aussi démontré que le développement des cellules FO et MZ résultait de processus indépendants. Afin de mieux caractériser ces deux sous-types cellulaires chez les souris Tg, il serait intéressant de faire des marquages immunohistologiques sur la rate afin de visualiser la localisation des deux populations et de voir si un type cellulaire colonise la niche de l'autre type comme cela l'a été suggéré par l'équipe de Benlagha.<sup>403</sup> Il serait également intéressant d'élucider le mécanisme, qui semble être déficient chez les cellules qui expriment lip35, conduisant au développement des cellules MZ. La durée de vie des cellules MZ pourrait être en cause, comme cela a été démontré pour les cellules FO chez les souris mliKO.<sup>403</sup> Pour observer la durée de vie des cellules MZ, les souris pourraient être exposées deux semaines à du BrdU puis les cellules B de la rate seraient observées au FACS.<sup>403</sup> Ce résultat nous informerait sur la durée de vie des cellules MZ ainsi que leur vitesse de renouvellement.

Enfin, pour élucider le mécanisme général d'action d'lip35 dans la survie des cellules B, il faudrait réaliser des expériences supplémentaires. Plusieurs études ont démontré que le MIF se liait à li en surface et induisait une cascade de signalisation impliquant les protéines Syk, Akt et ERK1/2 ce qui conduisait à l'activation de NF-κB et à la transcription des molécules Bcl-2, Bcl-XL et TAp63. Le résultat est l'entrée en phase S, la survie et la prolifération des cellules.<sup>374, 391, 392, 394</sup> Sachant qu'lip35 n'est pas détectable à la surface par marquage avec un anticorps, il est très peu probable que le MIF se lie à lip35 et induise une réponse. Par ailleurs, l'absence d'expression d'lip35 en surface concorde avec les études précédentes qui démontrent qu'lip35 n'est détecté en surface que lorsque l'internalisation est bloquée. Même dans des cellules transfectées exprimant de forts niveaux d'lip35, aucune expression en surface n'est détectée. Ceci suggère que la liaison du MIF en surface n'est pas un prérequis pour le développement des cellules. Cependant, pour exclure cette possibilité, il faudrait stimuler des splénocytes avec du MIF afin de déterminer si les cellules issues de souris Tgp35/mliKO sont induites et prolifèrent. Pour

cela, la prolifération peut être mesurée par l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine et la division des cellules par un marquage à l'iodure de propidium.<sup>374, 392</sup> Il a été démontré que l'internalisation du MIF peut avoir lieu dans des cellules non immunes, ce qui suggère que le MIF peut être endocyté même en absence d'Ii.<sup>462</sup> On peut alors spéculer, qu'en absence d'expression d'Ii en surface, MIF serait internalisé dans les endosomes dans lesquels il induirait le clivage d'Ii. Chez les cellules de souris Tgp35/mliKO qui expriment des niveaux intermédiaires d'lip35 et qui se développent correctement en FO, il serait intéressant de déterminer si la voie de signalisation du MIF est activée. Par exemple, il faudrait déterminer par immunoprécipitation et western blot si les protéines Syk, Akt et ERK1/2 sont phosphorylées.<sup>270, 374, 392</sup> Pour observer l'induction de la transcription, il est possible de détecter, par RT-PCR, les niveaux d'ARN de Bcl-2, Bcl-XL et TAp63.<sup>392, 393</sup> Il faudrait au préalable, trier les cellules qui expriment lip35. Cependant, le problème de ces expériences sera de distinguer le phénotype des cellules lip35<sup>int</sup> et lip35<sup>high</sup>.

Par ailleurs, l'équipe de Shachar a démontré que le fragment 1-82 d'Ii était suffisant pour induire la maturation des cellules B. De plus, le clivage intramembranaire du fragment 1-82 génère le segment 1-42 qui migre dans le noyau et active directement NF- $\kappa$ B.<sup>391, 394</sup> Dans ces expériences, même sans stimulation préalable par le MIF, le fragment 1-42 est généré et l'expression de ce fragment, ou du fragment plus long 1-82, est suffisante pour activer NF- $\kappa$ B et la prolifération des cellules. Ces résultats concordent avec les nôtres qui démontrent qu'lip35<sup>int</sup> rétablit le développement des cellules FO. Ceci suggère que dans nos souris Tg, lip35 est clivé au niveau du domaine transmembranaire, comme Ii murin, et qu'il active NF- $\kappa$ B. Pour démontrer cette hypothèse, il faudrait tout d'abord vérifier que le clivage transmembranaire d'lip35 a réellement lieu chez nos souris Tg. Pour cela, il faudrait réaliser une immunoprécipitation en utilisant l'anticorps Pin-1, spécifique du domaine cytoplasmique d'Ii humain, puis de procéder à un western blot en utilisant ce même anticorps. Ceci permettra de détecter la queue cytoplasmique d'lip35 et aussi, le cas échéant, le fragment clivé.<sup>394</sup> Ce fragment devrait être formé par les résidus 1

à 98 de l'isoforme lip35 (1-98-lip35). Afin de vérifier qu'lip35 est bien capable d'induire NF-κB, on pourrait utiliser un gène rapporteur luciférase placé en aval du promoteur humain de NF-κB. Une transfection du plasmide rapporteur ainsi qu'lip35 pourrait être faite dans les cellules humaines HEK293T.<sup>391</sup> Un plasmide contenant le fragment cytoplasmique 1-98-lip35 devra être ajouté pour démontrer que c'est bel et bien ce fragment qui est responsable de l'activation de NF-κB et qu'il est équivalent au segment 1-82 d'Ii murin. Ensuite, il serait intéressant de générer une souris Tg semblable à celle de Matza et al, mais qui exprimerait le fragment 1-98-lip35 au lieu du fragment 1-82 d'Ii murin.<sup>390</sup> Pour déterminer si ce fragment d'lip35 induit la maturation des cellules B comme le fait celui d'Ii murin, des marquages de cellules B dans la moelle, la rate et les ganglions pourraient être réalisés. De plus, des marquages de cellules B au CFSE pourraient démontrer si les cellules B de la souris exprimant 1-98-lip35 se divisent plus que celles des souris mliKO.

Toutes ces expériences permettront d'éclaircir le mécanisme d'action d'lip35 sur le développement des cellules B.

#### **4.5. L'impact d'lip35 sur la fonction des cellules B**

Nos résultats ont démontré que les cellules B lip35<sup>int</sup> se développent correctement en cellules matures FO. Cependant, on ne sait pas si ces cellules sélectionnées sont fonctionnelles comme le sont les cellules B des souris WT qui expriment Ii murin. L'immunisation par l'antigène OVA n'a pas conduit à la production d'anticorps IgG spécifiques chez les souris Tgp35/mliKO (résultats non publiés). Ceci peut être dû à des cellules B non fonctionnelles ou au faible nombre de cellules B matures. En effet, seul un petit nombre de cellules B expriment lip35, donc chez les souris Tgp35/mliKO, la proportion de cellules B matures demeure très faible. La réponse immunitaire demande

aussi la coopération des cellules T. Pour observer directement la fonction des cellules B, indépendamment des cellules T, on pourrait immuniser des souris avec un antigène T-indépendant comme le TNP-BA (trinitrophényl conjugué à *Brucella abortus*) ou TNP-LPS (trinitrophényl-LPS).<sup>387, 463, 464</sup> La réponse anticorps nous permettra de savoir si les cellules B, par elles-mêmes, sont capables de reconnaître l'antigène et de produire des anticorps. De plus, une quantification des isotypes IgM et IgG permettra également d'évaluer la capacité des cellules B à réaliser la commutation de classes. Enfin, il serait intéressant de tester la réponse dépendante des cellules T en immunisant les souris avec d'autres antigènes que l'OVA.

#### **4.6. Le rôle d'lip35 dans le développement des cellules T**

Les souris déficientes en chaîne invariante ont un répertoire de peptides moins diversifié que celui des souris WT, ce qui cause un défaut de sélection thymique conduisant à une réduction du nombre de cellules T CD4+ dans le thymus et en périphérie.<sup>251, 252, 349</sup> Dans nos souris Tgp35/mliKO, le nombre de TEC exprimant lip35 est réduit par rapport aux cellules WT et le CMH II en surface est augmenté à des niveaux intermédiaires entre celui des cellules WT et mliKO (Figure 3-1 et Figure 3-2). Malgré cela, lip35 rétablit complètement la sélection thymique (Figure 3-2). De plus, le niveau d'expression du TCR à la surface des cellules T, qui est réduit chez les souris mliKO, est totalement rétabli par lip35. Ces résultats démontrent qu'lip35 est capable de diversifier le répertoire de peptides ce qui permet la sélection thymique positive et qu'il restaure également l'expression correcte du TCR. De plus, ceci concorde avec les études précédentes qui démontraient que des faibles niveaux d'expression du CMH II ou d'I étaient suffisants pour rétablir complètement la sélection thymique.<sup>351, 352</sup>

Cependant, des expériences complémentaires pourraient être effectuées pour caractériser plus en détail les cellules T CD4+ sélectionnées afin de déterminer si elles sont fonctionnelles. Il serait intéressant de tester leur réactivité à des mitogènes comme la

concanavaline A ou l'anticorps anti-CD3 pour tester si le signal est transduit correctement par le TCR. On s'attend à ce que les cellules des souris Tgp35/mliKO répondent correctement puisque celles des souris mliKO en sont capables.<sup>349</sup> Il a également été démontré que les souris mliKO ont un nombre accru de cellules T CD4+ présentant un phénotype activé (CD44<sup>high</sup>, CD69<sup>high</sup> et CD45RB<sup>low</sup>).<sup>349, 351, 352</sup> Pour déterminer si lip35 rétablit le phénotype sauvage, les cellules T CD4+ pourraient être marquées avec les anticorps anti- CD44, -CD69 et -CD45RB. Enfin, pour déterminer si elles sont capables de répondre correctement à une stimulation antigénique, on pourrait faire un test de présentation antigénique utilisant des APC WT irradiées afin d'exclure un effet dû à l'absence d'Ii sur les APC. Ainsi, la réponse observée sera spécifiquement celle des cellules T CD4+ issues des souris Tgp35/mliKO. Ces expériences permettraient de déterminer plus spécifiquement si les cellules T CD4+ sélectionnées chez les souris Tgp35/mliKO sont totalement fonctionnelles.

Par ailleurs, pour mieux caractériser le répertoire peptidique, il serait intéressant d'identifier la nature et l'abondance des peptides associés au CMH II en comparant le peptidome associé au CMH II chez les souris Tgp35/mliKO par rapport aux souris WT et mliKO. Pour cela, les splénocytes de souris pourraient être lysés, le CMH II purifié par chromatographie d'affinité puis les peptides liés seraient élusés et séparés par chromatographie liquide et enfin, analysés par spectrométrie de masse.<sup>465-467</sup> Ceci permettrait d'évaluer si le répertoire de peptides des souris Tgp35/mliKO est différent de celui des souris WT et donc si lip35 a une influence différente d'Ii murin sur celui-ci.

D'autre part, une association du CMH II avec certains peptides peut induire un biais dans la sélection du répertoire Vβ. Nous nous sommes donc penchés sur la sélection de ce répertoire. Chez les souris mliKO, on observe plus de cellules exprimant Vβ5 et Vβ17 que chez les souris WT (Figure 3-2). On sait que les souris C57BL/6 expriment des superantigènes (SAg) endogènes de type MMTV (*mouse mammary tumor virus*) et en

particulier les MMTV 8, 9 et 17 qui causent la délétion clonale des cellules exprimant V $\beta$ 5 et V $\beta$ 17.<sup>112, 468, 469</sup> Ceci démontre qu'en absence de chaîne invariante, la présentation de ces SAg n'est pas optimale ce qui réduit la délétion des cellules T spécifiques. Les souris Tgp35/mliKO ont également une augmentation du nombre de cellules exprimant V $\beta$ 5 et 17, mais le phénotype est intermédiaire entre celui des souris WT et mliKO (Figure 3-2). Ces résultats démontrent qu'lip35 restaure la sélection thymique médiée par les peptides mais la présentation des SAg demeure affectée. Le phénotype intermédiaire observé chez les souris Tgp35/mliKO pourrait être dû au nombre réduit de TEC expriment lip35. Cela pourrait aussi être dû à un répertoire biaisé de peptides associés au CMH II qui réduirait la présentation des SAg, prévenant ainsi la sélection négative des cellules T qui nécessite des liaisons de forte avidité.<sup>470</sup>

Afin d'évaluer plus précisément la présentation des SAg, il serait intéressant d'évaluer la liaison et la présentation de SEA ou TSST-1 par exemple, qui sont des SAg bactériens dont la présentation est dépendante de la liaison d'un peptide sur le CMH II.<sup>471, 472</sup> Pour réaliser cela, les cellules de souris WT, mliKO et Tgp35/mliKO pourraient être incubées en présence de SAg marqué à la biotine ce qui permettrait la détection de la quantité de SAg lié. Un ratio de la liaison du SAg sur l'expression du CMH II nous donnerait une indication sur la capacité de liaison des SAg sur les différentes cellules. De plus, il est possible de faire un test de présentation antigénique avec ces SAg. Des splénocytes, issus de nos souris Tg, pourraient être incubés en présence de SEA ou TSST-1 et d'hybridomes T spécifiques (I1B3 et KOX15.5.8 respectivement).<sup>471, 473</sup> La stimulation des cellules T nous donnera une indication sur l'efficacité de présentation des SAg. On s'attend ce que les cellules mliKO lient et présentent peu les SAg et qu'lip35 rétablisse partiellement cette présentation.

#### **4.7. Le rôle d'lip35 dans la présentation antigénique**

Il a été démontré que certains antigènes, tels que l'OVA, requièrent la chaîne invariante pour être correctement présentés. Les macrophages de souris mliKO ne sont donc pas capables d'assurer la présentation antigénique de l'OVA aux cellules T. Quant à lip35, il restaure la présentation de cet antigène même si la stimulation des cellules T n'égale pas celle des souris WT (Figure 3-5). Compte tenu du nombre réduit de macrophages exprimant lip35 par rapport à ceux exprimant mli, on peut conclure qu'lip35 est capable d'assurer la présentation antigénique d'un épitope dépendant d'li et qu'il est fonctionnel.

Cependant, pour démontrer qu'lip35 est capable de restaurer la présentation antigénique de manière générale et pas seulement celle de l'OVA, il faudrait refaire cette expérience en utilisant d'autres antigènes dont la présentation dépend d'li, comme HEL ou KLH.<sup>251, 252, 346</sup> Pour comparer la capacité de présentation antigénique d'lip35 à lip33, il est également possible d'utiliser des lignées humaines transfectées avec lip33 et/ou lip35 et de mesurer la stimulation de cellules T spécifiques. Ceci nous permettrait de voir si lip35 est aussi efficace qu'lip33 pour présenter un antigène, en comparant avec des cellules exprimant lip33 et lip35 ensemble, qui est la condition physiologique.

#### **4.8. Perspectives**

##### **4.8.1. Le rôle d'li comme molécule clé de la signalisation par les cytokines**

Il a été démontré que d'autres cytokines, telles que midkine (MK) et HGF, dépendent d'li dans leur rôle sur le développement des cellules B.<sup>396, 397</sup> Il serait intéressant d'évaluer l'impact de ces cytokines sur les cellules issues de souris Tgp35/mliKO. L'expression de HGF, et de son récepteur c-Met, est activée après induction

par MIF.<sup>396</sup> Il serait intéressant d'évaluer, par FACS, l'expression de ces deux protéines dans les différents stades de maturation des cellules B. Ceci nous permettra de vérifier si lip35 a un impact sur l'expression de c-Met et HGF au cours de la maturation des cellules B chez les souris Tgp35/mliKO. De plus, pour déterminer l'impact de la stimulation par HGF, des cellules issues des souris Tgp35/mliKO pourraient être incubées en présence d'HGF et marquées afin de déterminer si HGF a induit un processus de maturation chez ces cellules. Les mêmes expériences pourraient être réalisées avec la cytokine MK dont le système d'activation et d'action est sensiblement le même.

Ces expériences permettraient de déterminer si ces cytokines ont un effet restreint à li murin (ou lip33) ou si lip35 est également impliqué dans leur voie de signalisation. Si l'effet est restreint à lip33 ou mli, cela suggèrerait que l'action de ces cytokines commencerait à la surface cellulaire, par la liaison à lip33 ou mli. Par contre, lip35 n'étant pas détectable en surface, il n'aurait donc pas d'effet sur l'action de ces cytokines. A contrario, si lip35 est impliqué dans la voie de signalisation de ces cytokines, au même titre qu'lip33 ou mli, cela suggèrerait que l'expression en surface n'est pas un prérequis pour la signalisation. Dans ce cas, les cytokines pourraient être internalisées dans les endosomes contenant les différentes isoformes d'li. Le clivage d'li et l'initiation de la cascade de signalisation auraient alors lieu directement dans ces compartiments.

#### **4.8.2. Le rôle d'li comme récepteur d'adhésion des bactéries**

Il a été démontré que la bactérie *H. pylori* se lie à li en surface, ce qui permet son adhésion et conduit à l'infection et la persistance de la bactérie.<sup>419, 421</sup> Il serait intéressant de voir l'effet d'une infection par *H. pylori* chez nos souris Tgp35/mliKO. On s'attend à une résistance à l'infection puisqu'lip35 n'est pas détecté à la surface. Par ailleurs, il est possible que d'autres bactéries ou levures utilisent aussi li comme récepteur d'adhésion. Nous avons réalisé des expériences préliminaires d'infection bucale de souris par la levure *Candida albicans*.<sup>474</sup> Comme attendu, nos résultats ont démontré que la cavité bucale des

souris WT est colonisée par *C. albicans* avec un pic deux à trois jours après inoculation et que les souris éliminent le pathogène après sept à huit jours.<sup>474,475</sup> Par contre, les souris mliKO ne sont jamais colonisées, c'est-à-dire qu'on n'observe aucune augmentation ni variation dans le nombre de levure dans la cavité bucale. Ceci suggère que les souris n'éliminent pas le pathogène plus rapidement mais qu'elles sont belles et bien résistantes à l'infection. *C. albicans* pourrait donc aussi utiliser li comme récepteur pour permettre son adhésion et son infection subséquente. Ces résultats sont préliminaires mais, dans ce contexte, la suite logique de ces expériences sera de déterminer si les souris Tgp35/mliKO sont également résistantes. Ces résultats ouvrent la porte à une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement ou la prévention de l'infection par *C. albicans*. Par exemple, au niveau des tissus infectés, le blocage d'li en surface par un anticorps pourrait permettre d'endiguer l'infection en bloquant la liaison des levures à la surface des cellules.

#### 4.8.3. Le rôle d'lip35 sur la mobilité des DC

Il a été démontré qu'il était impliqué dans le contrôle de la mobilité des DC. La chaîne invariante interagit avec le moteur de myosine II qui contrôle les contractions d'actomyosine ce qui lui permet de réguler la mobilité des cellules.<sup>431, 432</sup> Les DC déficientes en chaîne invariante ont donc un déplacement continu et rapide alors que les cellules WT alternent entre des phases de déplacements rapides et lents.<sup>432</sup> L'effet d'lip35 sur ce phénomène n'est pas connu. Tout d'abord, il serait intéressant de déterminer si lip35 interagit avec le moteur de myosine II. Pour cela, une immunoprecipitation d'li puis un western blot anti-myosine pourraient être réalisés.<sup>431</sup> Ensuite, pour déterminer l'effet d'lip35 sur la vitesse de mouvement des cellules, il faudrait isoler les DC de souris Tgp35/mliKO et mesurer leur déplacement dans des microtunnels par imagerie comme décrit par Faure-André et al.<sup>432</sup> Vascotto et al, ont suggéré que la myosine II pourrait interagir avec la queue cytoplasmique d'li. On peut spéculer que la liaison de la myosine II

avec lip35 serait différente de celle avec lip33 ou mli et qu'lip35 agirait comme régulateur de la mobilité induite par li.

#### 4.8.4. Le rôle d'lip35 dans l'infection par le VIH

Il a été démontré que la protéine Nef du VIH interagit avec la chaîne invariante et augmente l'expression de surface de cette dernière en entrant en compétition avec elle pour la liaison à AP2.<sup>433, 434, 438, 439</sup> Il est donc endocyté beaucoup moins efficacement et s'accumule à la surface. Il serait intéressant d'évaluer si Nef interagit efficacement avec lip35 en réalisant une IP suivie d'un western blot. Ensuite, il faudrait déterminer l'impact de Nef sur l'expression en surface d'lip35. On sait qu'lip35 est internalisé très rapidement ce qui conduit à une expression non détectable en surface. Des cellules humaines exprimant lip35 pourraient être transfectées avec la protéine Nef et l'expression d'lip35 en surface mesurée. On s'attend à une augmentation du niveau d'lip35 en surface. Par ailleurs, la protéine Vpu interagit avec la queue cytoplasmique d'li<sup>442</sup> donc il faudrait évaluer son interaction avec lip35, qui pourrait être différente à cause de l'extension du domaine cytoplasmique d'lip35. De plus, il faudrait évaluer, dans des cellules humaines exprimant lip35, si la protéine Vpu réduit les niveaux de CMH II à la surface comme elle le fait in vivo.<sup>442</sup> Ces expériences permettraient d'évaluer plus précisément l'impact d'li dans l'infection du VIH et si lip35 a un rôle particulier et différent de celui d'lip33.

# Chapitre 5. Conclusion

---

La chaîne invariante est une protéine ayant un champ d'action très large qui ne cesse de se diversifier. Il a un impact sur l'assemblage, la conformation, le transport et l'expression de surface du CMH II. Il permet la présentation antigénique ainsi que la sélection thymique des cellules T CD4+ et iNKT. Il a également de nombreux effets indépendants de son rôle de chaperon du CMH II. Il est le récepteur du MIF et induit la maturation des cellules B. Il est une cible qui facilite l'infection par *H. pylori* ou le VIH et il contrôle la mobilité des DC. L'isoforme humaine lip35 est particulière par son motif R-x-R de rétention dans le RE. Elle influence le transport et l'expression du CMH II. Cependant, le rôle physiologique du motif de rétention demeure nébuleux et peu de recherches ont été effectuées pour l'élucider.

Les souris Tg exprimant lip35 seul ou en combinaison avec li murin, que nous avons générées, ont permis d'évaluer l'impact d'lip35 sur de nombreux rôles connus d'li. Nous avons démontré qu'lip35 augmente l'expression de surface du CMH II murin et qu'il induit une conformation compacte réfractaire à la liaison de peptides exogènes. De plus, malgré l'accumulation intracellulaire de CMH II ayant une conformation AF6-120.1+, lip35 permet la maturation des cellules B en cellules matures folliculaires. Par contre, il n'assure pas le développement des cellules MZ. Ces résultats suggèrent qu'lip35 peut induire la cascade de signalisation sans stimulation préalable du MIF. De plus, lip35 diversifie le répertoire de peptides et rétablit totalement la sélection thymique des cellules T CD4+ et iNKT. Il assure également la présentation antigénique de l'OVA mais la présentation de superantigènes demeure affectée. D'autres questions demeurent en suspens comme le mécanisme précis par lequel lip35 induit la maturation des cellules B ou encore son rôle dans mobilité des DC ou l'infection par le VIH.

Nos résultats ont permis de démontrer qu'lip35 est fonctionnel et est capable d'assurer de nombreuses fonctions d'li, mais ne peut remplacer le li murin endogène. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'humain exprime l'isoforme lip35 contrairement à la souris.

L'isoforme lip35 pourrait être un avantage développé au cours de l'évolution et qui permettrait une régulation fine de la réponse immunitaire. En effet, en forçant la formation de nonamères (li-CMH II)<sub>3</sub> et en provoquant la rétention partielle d'li murin, il augmenterait le temps passé dans le RE et réduirait la dégradation d'li.<sup>221</sup> Ceci aboutirait à une réduction de la présentation antigénique. Ainsi, chez les humains, la régulation fine de l'expression d'lip35 permettrait un contrôle très sensible de la réponse immunitaire. Ceci concorde avec les études qui démontrent que l'expression d'lip35 est anormale dans des cellules de patients diabétiques ou encore dans les cancers CLL. Dans ces derniers, lip35 est surexprimé ce qui implique qu'il y a une augmentation de l'initiation de la traduction au niveau du premier codon. Le mécanisme responsable de cette augmentation n'est pas élucidé. Cependant, on sait que la présence d'une séquence kozak, et en particulier la présence d'une purine en position -3 du codon d'initiation, augmente considérablement l'initiation de la traduction.<sup>476, 477</sup> Cette séquence est présente en amont du deuxième codon d'initiation d'li, mais pas du premier.<sup>197</sup> C'est ce qui conduit à la traduction accrue de l'isoforme lip33 par rapport à lip35. On peut alors spéculer, que dans des cellules issues de cancers CLL, une mutation de la cytosine en position -3 du premier codon d'li, pourrait conduire à la présence d'une purine, ce qui augmenterait significativement la traduction et l'expression de l'isoforme lip35. Cependant, cette hypothèse n'a pas été testée et demeure spéculative.

Ainsi, lip35 pourrait avoir un impact majeur sur le développement de désordres immuns. lip35 pourrait également être un marqueur de diagnostic ou de pronostic pour les cancers CLL. Enfin, il pourrait éventuellement servir de cible pour les thérapies futures.

# Bibliographie

---

1. Gorer,P.A., Lyman,S., & Snell,G.D. Studies on the Genetic and Antigenic Basis of Tumour Transplantation. Linkage between a Histocompatibility Gene and 'Fused' in Mice. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* **135**, 499-505 (1948).
2. Snell,G.D. & HIGGINS,G.F. Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. *Genetics* **36**, 306-310 (1951).
3. Dausset,J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* **20**, 156-166 (1958).
4. Klein,J. & Sato,A. Birth of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* **47**, 199-209 (1998).
5. Murphy,W.J. *et al.* Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science* **294**, 2348-2351 (2001).
6. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* **401**, 921-923 (1999).
7. Yuhki,N. *et al.* Comparative genome organization of human, murine, and feline MHC class II region. *Genome Res.* **13**, 1169-1179 (2003).
8. Ohtsuka,M., Inoko,H., Kulski,J.K., & Yoshimura,S. Major histocompatibility complex (Mhc) class Ib gene duplications, organization and expression patterns in mouse strain C57BL/6. *BMC. Genomics* **9**, 178 (2008).
9. Janeway,C.A., Jr. *Immunobiology*, 8th edition (Garland Science, Taylor & Francis Group, 2012).
10. Cox,D.R., Sawicki,J.A., Yee,D., Appella,E., & Epstein,C.J. Assignment of the gene for beta 2-microglobulin (B2m) to mouse chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**, 1930-1934 (1982).
11. Kucherlapati,R.S., Faber,H.E., Poulik,M.D., Ruddle,F.H., & Simithes,O. Assignment of the gene for beta-2-microglobulin to human chromosome 15. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* **12**, 178-180 (1976).
12. Collins,E.J., Garboczi,D.N., Karpas,M.N., & Wiley,D.C. The three-dimensional structure of a class I major histocompatibility complex molecule missing the a3 domain of the heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1218-1221 (1995).
13. Stura,E.A. *et al.* Crystallization of murine major histocompatibility complex class I H-2K<sup>b</sup> with single peptides. *J. Mol. Biol.* **228**, 975-982 (1992).
14. Fremont,D.H., Matsumura,M., Stura,E.A., Peterson,P.A., & Wilson,I.A. Crystal structure of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K<sup>b</sup>. *Science* **257**, 919-927 (1992).
15. Madden,D.R., Garboczi,D.N., & Wiley,D.C. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* **75**, 693-708 (1993).
16. Matsumura,M., Fremont,D.H., Peterson,P.A., & Wilson,I.A. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* **257**, 927-934 (1992).

17. Madden,D.R., Gorga,J.C., Strominger,J.L., & Wiley,D.C. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* **353**, 321-325 (1991).
18. Singer,D.S. & Maguire,J.E. Regulation of the expression of class I MHC genes. *Crit Rev. Immunol.* **10**, 235-257 (1990).
19. Le,B.P. HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit Rev. Immunol.* **14**, 89-129 (1994).
20. Johnson,D.R. & Pober,J.S. HLA class I heavy-chain gene promoter elements mediating synergy between tumor necrosis factor and interferons. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1322-1332 (1994).
21. Bikoff,E.K. *et al.* MHC class I surface expression in embryo-derived cell lines inducible with peptide or interferon. *Nature* **354**, 235-238 (1991).
22. Chang,C.H., Hammer,J., Loh,J.E., Fodor,W.L., & Flavell,R.A. The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Immunogenetics* **35**, 378-384 (1992).
23. Darnell,J.E., Jr., Kerr,I.M., & Stark,G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421 (1994).
24. Martin,B.K. *et al.* Induction of MHC class I expression by the MHC class II transactivator CIITA. *Immunity*. **6**, 591-600 (1997).
25. Trowsdale,J. HLA genomics in the third millennium. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 498-504 (2005).
26. Colbert,R.A., DeLay,M.L., Klenk,E.I., & Layh-Schmitt,G. From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. *Immunol. Rev.* **233**, 181-202 (2010).
27. Neumann-Haefelin,C. *et al.* Protective effect of human leukocyte antigen B27 in hepatitis C virus infection requires the presence of a genotype-specific immunodominant CD8+ T-cell epitope. *Hepatology* **51**, 54-62 (2010).
28. Alfonso,C. & Karlsson,L. Nonclassical MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 113-142 (2000).
29. Cresswell,P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* **84**, 505-507 (1996).
30. Warren,E.H. Diversifying the MHC peptide portfolio. *Blood* **120**, 3165-3167 (2012).
31. Horton,R. *et al.* Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 889-899 (2004).
32. Shiina,T., Inoko,H., & Kulski,J.K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* **64**, 631-649 (2004).
33. Trowsdale,J. Genomic structure and function in the MHC. *Trends Genet.* **9**, 117-122 (1993).
34. Beck,S. & Trowsdale,J. Sequence organisation of the class II region of the human MHC. *Immunol. Rev.* **167**, 201-210 (1999).
35. Allcock,R.J., Martin,A.M., & Price,P. The mouse as a model for the effects of MHC genes on human disease. *Immunol. Today* **21**, 328-332 (2000).

36. Jeffreys,A.J., Kauppi,L., & Neumann,R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat. Genet.* **29**, 217-222 (2001).
37. Grahovac,B. *et al.* Polymorphism of the HLA class II loci in Siberian populations. *Hum. Genet.* **102**, 27-43 (1998).
38. Waldburger,J.M. *et al.* Promoter IV of the class II transactivator gene is essential for positive selection of CD4+ T cells. *Blood* **101**, 3550-3559 (2003).
39. Collins,T. *et al.* Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 4917-4921 (1984).
40. Taxman,D.J., Cressman,D.E., & Ting,J.P. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *J. Immunol.* **165**, 1410-1416 (2000).
41. Ting,J.P., Wright,K.L., Chin,K.C., Brickey,W.J., & Li,G. The DMB promoter: delineation, *in vivo* footprint, trans-activation, and trans-dominant suppression. *J. Immunol.* **159**, 5457-5462 (1997).
42. Tai,A.K., Zhou,G., Chau,K., & Ono,S.J. Cis-element dependence and occupancy of the human invariant chain promoter in CIITA-dependent and -independent transcription. *Mol. Immunol.* **36**, 447-460 (1999).
43. Bellorini,M. *et al.* The major histocompatibility complex class II Ea promoter requires TFIID binding to an initiator sequence. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 503-512 (1996).
44. Garvie,C.W. *et al.* Characterization of the RFX complex and the RFX5(L66A) mutant: implications for the regulation of MHC class II gene expression. *Biochemistry* **46**, 1597-1611 (2007).
45. Moreno,C.S., Beresford,G.W., Louis-Plence,P., Morris,A.C., & Boss,J.M. CREB regulates MHC class II expression in a CIITA-dependent manner. *Immunity* **10**, 143-151 (1999).
46. Lochamy,J., Rogers,E.M., & Boss,J.M. CREB and phospho-CREB interact with RFX5 and CIITA to regulate MHC class II genes. *Mol. Immunol.* **44**, 837-847 (2007).
47. Masternak,K. *et al.* CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev.* **14**, 1156-1166 (2000).
48. Garvie,C.W. & Boss,J.M. Assembly of the RFX complex on the MHCII promoter: role of RFXAP and RFXB in relieving autoinhibition of RFX5. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 797-804 (2008).
49. Ting,J.P., Kastner,D.L., & Hoffman,H.M. CATERPILLERs, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 183-195 (2006).
50. Reith,W., LeibundGut-Landmann,S., & Waldburger,J.M. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 793-806 (2005).
51. Steimle,V., Otten,L.A., Zufferey,M., & Mach,B. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* **75**, 135-146 (1993).

52. Xi,H. *et al.* Co-occupancy of the interferon regulatory element of the class II transactivator (CIITA) type IV promoter by interferon regulatory factors 1 and 2. *Oncogene* **18**, 5889-5903 (1999).
53. Dong,Y., Tang,L., Letterio,J.J., & Benveniste,E.N. The Smad3 protein is involved in TGF-beta inhibition of class II transactivator and class II MHC expression. *J. Immunol.* **167**, 311-319 (2001).
54. LeibundGut-Landmann,S., Waldburger,J.M., Reis e Sousa, Acha-Orbea,H., & Reith,W. MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat. Immunol.* **5**, 899-908 (2004).
55. Waldburger,J.M., Suter,T., Fontana,A., Acha-Orbea,H., & Reith,W. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J. Exp. Med.* **194**, 393-406 (2001).
56. Muhlethaler-MOttet,A., Otten,L.A., Steimle,V., & Mach,B. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J.* **16**, 2851-2860 (1997).
57. Pai,R.K., Askew,D., Boom,W.H., & Harding,C.V. Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator. *J. Immunol.* **169**, 1326-1333 (2002).
58. Landmann,S. *et al.* Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J. Exp. Med.* **194**, 379-391 (2001).
59. Nickerson,K. *et al.* Dendritic cell-specific MHC class II transactivator contains a caspase recruitment domain that confers potent transactivation activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 19089-19093 (2001).
60. Otten,L.A. *et al.* Deregulated MHC class II transactivator expression leads to a strong Th2 bias in CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **170**, 1150-1157 (2003).
61. Holling,T.M., van der Stoep,N., Quinten,E., & Van den Elsen,P.J. Activated human T cells accomplish MHC class II expression through T cell-specific occupation of class II transactivator promoter III. *J. Immunol.* **168**, 763-770 (2002).
62. Morris,A.C., Spangler,W.E., & Boss,J.M. Methylation of class II trans-activator promoter IV: a novel mechanism of MHC class II gene control. *J. Immunol.* **164**, 4143-4149 (2000).
63. Tosi,G., Jabrane-Ferrat,N., & Peterlin,B.M. Phosphorylation of CIITA directs its oligomerization, accumulation and increased activity on MHCII promoters. *EMBO J.* **21**, 5467-5476 (2002).
64. Greer,S.F. *et al.* Serine residues 286, 288, and 293 within the CIITA: a mechanism for down-regulating CIITA activity through phosphorylation. *J. Immunol.* **173**, 376-383 (2004).
65. Greer,S.F., Zika,E., Conti,B., Zhu,X.S., & Ting,J.P. Enhancement of CIITA transcriptional function by ubiquitin. *Nat. Immunol.* **4**, 1074-1082 (2003).

66. Morrison,T.E., Mauser,A., Wong,A., Ting,J.P., & Kenney,S.C. Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity*. **15**, 787-799 (2001).
67. Rakoff-Nahoum,S. et al. Regulation of class II expression in monocytic cells after HIV-1 infection. *J. Immunol.* **167**, 2331-2342 (2001).
68. Ploegh,H.L., Orr,H.T., & Strominger,J.L. Molecular cloning of a human histocompatibility antigen cDNA fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 6081-6085 (1980).
69. Kaufman,J.F., Auffray,C., Korman,A.J., Shackelford,D.A., & Strominger,J. The Class II Molecules of the Human and Murine Major Histocompatibility Complex. *Cell* **36**, 1-13. 1984.

## Ref Type: Journal (Full)

70. Rudensky,A. & Janeway,C.A., Jr. Studies on naturally processed peptides associated with MHC class II molecules. *Chem. Immunol.* **57**, 134-151 (1993).
71. Stern,L.J. et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* **368**, 215-221 (1994).
72. Brown,J.H. et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**, 33-39 (1993).
73. Dessen,A., Lawrence,C.M., Cupo,S., Zaller,D.M., & Wiley,D.C. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA\*0101, DRB1\*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity* **7**, 473-481 (1997).
74. Ghosh,P., Amaya,M., Mellins,E., & Wiley,D.C. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* **378**, 457-462 (1995).
75. Fremont,D.H., Hendrickson,W.A., Marrack,P., & Kappler,J. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* **272**, 1001-1004 (1996).
76. Scott,C.A., Peterson,P.A., Teyton,L., & Wilson,I.A. Crystal structures of two I-Ad-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues. *Immunity* **8**, 319-329 (1998).
77. McFarland,B.J. & Beeson,C. Binding interactions between peptides and proteins of the class II major histocompatibility complex. *Med. Res. Rev.* **22**, 168-203 (2002).
78. Jardetzky,T.S. et al. Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 734-738 (1996).
79. Rammensee,H.-G., Friede,T., & Stevanovic,S. MHC ligands and peptide motifs: First listing. *Immunogenetics* **41**, 178-228 (1995).
80. Hammer,J. et al. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* **74**, 197-203 (1993).
81. O'Sullivan,D. et al. On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs. *J. Immunol.* **147**, 2663-2669 (1991).
82. Garboczi,D.N. et al. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* **384**, 134-141 (1996).

83. Garcia,K.C. *et al.* Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* **279**, 1166-1172 (1998).
84. Gakamsky,D.M. *et al.* Kinetic evidence for a ligand-binding-induced conformational transition in the T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 16639-16644 (2007).
85. Borbulevych,O.Y. *et al.* T cell receptor cross-reactivity directed by antigen-dependent tuning of peptide-MHC molecular flexibility. *Immunity*. **31**, 885-896 (2009).
86. Dolan,B.P. *et al.* Distinct pathways generate peptides from defective ribosomal products for CD8+ T cell immunosurveillance. *J. Immunol.* **186**, 2065-2072 (2011).
87. Li,M. *et al.* Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome. *Science* **333**, 53-58 (2011).
88. Schubert,U. *et al.* Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-774 (2000).
89. Kisseelev,A.F., Akopian,T.N., Woo,K.M., & Goldberg,A.L. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **274**, 3363-3371 (1999).
90. Reits,E. *et al.* A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity*. **20**, 495-506 (2004).
91. Cascio,P., Hilton,C., Kisseelev,A.F., Rock,K.L., & Goldberg,A.L. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* **20**, 2357-2366 (2001).
92. Kloetzel,P.M. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* **5**, 661-669 (2004).
93. Toes,R.E. *et al.* Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* **194**, 1-12 (2001).
94. Seifert,U. *et al.* Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**, 613-624 (2010).
95. Klionsky,D.J. & Emr,S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717-1721 (2000).
96. Xie,Z. & Klionsky,D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1102-1109 (2007).
97. English,L. *et al.* Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* **10**, 480-487 (2009).
98. Wearsch,P.A. & Cresswell,P. The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 624-631 (2008).
99. Parcej,D. & Tampe,R. ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 572-580 (2010).
100. Blanchard,N. *et al.* Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells. *J. Immunol.* **184**, 3033-3042 (2010).
101. Serwold,T., Gonzalez,F., Kim,J., Jacob,R., & Shastri,N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**, 480-483 (2002).

102. York,I.A. *et al.* The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* **3**, 1177-1184 (2002).
103. Vassilakos,A., Cohen-Doyle,M.F., Peterson,P.A., Jackson,M.R., & Williams,D.B. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J.* **15**, 1495-1506 (1996).
104. Hughes,E.A. & Cresswell,P. The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex [In Process Citation]. *Curr Biol* **8**, 709-712 (1998).
105. Park,B. *et al.* Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell* **127**, 369-382 (2006).
106. Wearsch,P.A., Peaper,D.R., & Cresswell,P. Essential glycan-dependent interactions optimize MHC class I peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 4950-4955 (2011).
107. Ortmann,B. *et al.* A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* **277**, 1306-1309 (1997).
108. Cresswell,P., Bangia,N., Dick,T., & Diedrich,G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* **172**, 21-28 (1999).
109. Vyas,J.M., Van der Veen,A.G., & Ploegh,H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 607-618 (2008).
110. Neijssen,J. *et al.* Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* **434**, 83-88 (2005).
111. Pang,B. *et al.* Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during apoptosis. *J. Immunol.* **183**, 1083-1090 (2009).
112. Lamb,C.A. & Cresswell,P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J. Immunol.* **148**, 3478-3482 (1992).
113. Machamer,C.E. & Cresswell,P. Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J. Immunol.* **129**, 2564-2569 (1982).
114. Roche,P.A. *et al.* Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. *EMBO J.* **11**, 2841-2847 (1992).
115. Lotteau,V. *et al.* Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* **348**, 600-605 (1990).
116. Peters,P.J., Neefjes,J.J., Oorschot,V., Ploegh,H.L., & Geuze,H.J. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* **349**, 669-676 (1991).
117. Geuze,H.J. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* **19**, 282-287 (1998).
118. Neefjes,J.J., Stollorz,V., Peters,P.J., Geuze,H.J., & Ploegh,H.L. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* **61**, 171-183 (1990).
119. Kleijmeer,M.J., Morkowski,S., Griffith,J.M., Rudensky,A.Y., & Geuze,H.J. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J. Cell Biol.* **139**, 639-649 (1997).

120. Kleijmeer,M.J., Raposo,G., & Geuze,H.J. Characterization of MHC Class II Compartments by Immunoelectron Microscopy. *Methods* **10**, 191-207 (1996).
121. Amigorena,S. *et al.* Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J. Exp. Med.* **181**, 1729-1741 (1995).
122. Riese,R.J. *et al.* Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* **4**, 357-366 (1996).
123. Zwart,W. *et al.* Spatial separation of HLA-DM/HLA-DR interactions within MIIC and phagosome-induced immune escape. *Immunity* **22**, 221-233 (2005).
124. Fremont,D.H., Crawford,F., Marrack,P., Hendrickson,W.A., & Kappler,J. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* **9**, 385-393 (1998).
125. Mosyak,L., Zaller,D.M., & Wiley,D.C. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* **9**, 377-383 (1998).
126. Stebbins,C.C., Loss,G.E., Jr., Elias,C.G., Chervonsky,A., & Sant,A.J. The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J. Exp. Med.* **181**, 223-234 (1995).
127. Patil,N.S. *et al.* Rheumatoid arthritis (RA)-associated HLA-DR alleles form less stable complexes with class II-associated invariant chain peptide than non-RA-associated HLA-DR alleles. *J. Immunol.* **167**, 7157-7168 (2001).
128. Denzin,L.K. & Cresswell,P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II ab dimers and facilitates peptide loading. *Cell* **82**, 155-165 (1995).
129. Sloan,V.S. *et al.* Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA- DR. *Nature* **375**, 802-806 (1995).
130. Weber,D.A., Evavold,B.D., & Jensen,P.E. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* **274**, 618-620 (1996).
131. Kropshofer,H. *et al.* Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* **15**, 6144-6154 (1996).
132. Lich,J.D., Jayne,J.A., Zhou,D., Elliott,J.F., & Blum,J.S. Editing of an immunodominant epitope of glutamate decarboxylase by HLA-DM. *J. Immunol.* **171**, 853-859 (2003).
133. Kropshofer,H., Arndt,S.O., Moldenhauer,G., Hammerling,G.J., & Vogt,A.B. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* **6**, 293-302 (1997).
134. Grotenbreg,G.M. *et al.* Empty class II major histocompatibility complex created by peptide photolysis establishes the role of DM in peptide association. *J. Biol. Chem.* **282**, 21425-21436 (2007).
135. Anders,A.K. *et al.* HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide. *Nat. Immunol.* **12**, 54-61 (2011).
136. Germain,R.N. & Rinker Jr,A.G. Peptide binding inhibits protein aggregation of invariant-chain free class II dimers and promotes surface expression of occupied molecules. *Nature* **363**, 725-728 (1993).
137. Rabinowitz,J.D. *et al.* Formation of a highly peptide-receptive state of class II MHC. *Immunity* **9**, 699-709 (1998).

138. Denzin,L.K., 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.* **184**, 2153-2165 (1996).
139. Neefjes,J., Jongsma,M.L., Paul,P., & Bakke,O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823-836 (2011).
140. Pozzi,L.A., Maciaszek,J.W., & Rock,K.L. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *J. Immunol.* **175**, 2071-2081 (2005).
141. Hon,H., Oran,A., Brocker,T., & Jacob,J. B lymphocytes participate in cross-presentation of antigen following gene gun vaccination. *J. Immunol.* **174**, 5233-5242 (2005).
142. Tobian,A.A., Harding,C.V., & Canaday,D.H. Mycobacterium tuberculosis heat shock fusion protein enhances class I MHC cross-processing and -presentation by B lymphocytes. *J. Immunol.* **174**, 5209-5214 (2005).
143. Bonifaz,L.C. *et al.* In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* **199**, 815-824 (2004).
144. Ackerman,A.L. & Cresswell,P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat. Immunol.* **5**, 678-684 (2004).
145. Lizee,G. *et al.* Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* **4**, 1065-1073 (2003).
146. Sigal,L.J., Crotty,S., Andino,R., & Rock,K.L. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* **398**, 77-80 (1999).
147. Kovacsics-Bankowski,M. & Rock,K.L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**, 243-246 (1995).
148. Ackerman,A.L., Giodini,A., & Cresswell,P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* **25**, 607-617 (2006).
149. Houde,M. *et al.* Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402-406 (2003).
150. Burgdorf,S., Kautz,A., Bohnert,V., Knolle,P.A., & Kurts,C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* **316**, 612-616 (2007).
151. Liu,T., Zhou,X., Abdel-Motal,U.M., Ljunggren,H.G., & Jondal,M. MHC class I presentation of live and heat-inactivated Sendai virus antigen in T2Kb cells depends on an intracellular compartment with endosomal characteristics. *Scand. J. Immunol.* **45**, 527-533 (1997).
152. Shen,L., Sigal,L.J., Boes,M., & Rock,K.L. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**, 155-165 (2004).

153. Saveanu,L. *et al.* IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* **325**, 213-217 (2009).
154. Kleijmeer,M.J. *et al.* Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. *Traffic*. **2**, 124-137 (2001).
155. Basha,G. *et al.* MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS. ONE*. **3**, e3247 (2008).
156. Reid,P.A. & Watts,C. Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature* **346**, 655-657 (1990).
157. Powis,S.J. CLIP-region mediated interaction of Invariant chain with MHC class I molecules. *FEBS Lett.* **580**, 3112-3116 (2006).
158. Odorizzi,C.G. *et al.* Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J. Cell Biol.* **126**, 317-330 (1994).
159. Sugita,M. & Brenner,M.B. Association of the invariant chain with major histocompatibility complex class I molecules directs trafficking to endocytic compartments. *J. Biol. Chem.* **270**, 1443-1448 (1995).
160. Basha,G. *et al.* A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat. Immunol.* **13**, 237-245 (2012).
161. Dascher,C.C. & Brenner,M.B. Evolutionary constraints on CD1 structure: insights from comparative genomic analysis. *Trends Immunol.* **24**, 412-418 (2003).
162. Barral,D.C. & Brenner,M.B. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 929-941 (2007).
163. Stronge,V.S., Salio,M., Jones,E.Y., & Cerundolo,V. A closer look at CD1d molecules: new horizons in studying NKT cells. *Trends Immunol.* **28**, 455-462 (2007).
164. De la Salle,H. *et al.* Assistance of microbial glycolipid antigen processing by CD1e. *Science* **310**, 1321-1324 (2005).
165. Bonifacino,J.S. & Dell'Angelica,E.C. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* **145**, 923-926 (1999).
166. Briken,V., Jackman,R.M., Dasgupta,S., Hoening,S., & Porcelli,S.A. Intracellular trafficking pathway of newly synthesized CD1b molecules. *EMBO J.* **21**, 825-834 (2002).
167. Jayawardena-Wolf,J., Benlagha,K., Chiu,Y.H., Mehr,R., & Bendelac,A. CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity*. **15**, 897-908 (2001).
168. Kang,S.J. & Cresswell,P. Regulation of intracellular trafficking of human CD1d by association with MHC class II molecules. *EMBO J.* **21**, 1650-1660 (2002).
169. Sugita,M. *et al.* Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells. *Immunity*. **16**, 697-706 (2002).
170. Elewaut,D. *et al.* The adaptor protein AP-3 is required for CD1d-mediated antigen presentation of glycosphingolipids and development of Valpha14i NKT cells. *J. Exp. Med.* **198**, 1133-1146 (2003).
171. Garg,S. *et al.* Lysosomal trafficking, antigen presentation, and microbial killing are controlled by the Arf-like GTPase Arl8b. *Immunity*. **35**, 182-193 (2011).

172. Shamshiev,A. *et al.* Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules. *J. Exp. Med.* **195**, 1013-1021 (2002).
173. Yu,K.O. *et al.* Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 3383-3388 (2005).
174. Riese,R.J. *et al.* Regulation of CD1 function and NK1.1(+) T cell selection and maturation by cathepsin S. *Immunity*. **15**, 909-919 (2001).
175. Sloma,I. *et al.* Regulation of CD1a surface expression and antigen presentation by invariant chain and lipid rafts. *J. Immunol.* **180**, 980-987 (2008).
176. Honey,K., Nakagawa,T., Peters,C., & Rudensky,A. Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J. Exp. Med.* **195**, 1349-1358 (2002).
177. Chiu,Y.H. *et al.* Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d. *Nat. Immunol.* **3**, 55-60 (2002).
178. Bosma,A., Abdel-Gadir,A., Isenberg,D.A., Jury,E.C., & Mauri,C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity*. **36**, 477-490 (2012).
179. Sille,F.C. *et al.* Critical role for invariant chain in CD1d-mediated selection and maturation of Valpha14-invariant NKT cells. *Immunol. Lett.* **139**, 33-41 (2011).
180. Jones,P.P., Murphy,D.B., Hewgill,D., & McDevitt,H.O. Detection of a common polypeptide chain in I-A and I-E sub-region immunoprecipitates. *Mol. Immunol.* **16**, 51-60 (1979).
181. Charron,D.J. & McDevitt,H.O. Analysis of HLA-D region-associated molecules with monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 6567-6571 (1979).
182. Richards,J.E., Pravtcheva,D.D., Day,C., Ruddle,F.H., & Jones,P.P. Murine invariant chain gene: chromosomal assignment and segregation in recombinant inbred strains. *Immunogenetics* **22**, 193-199 (1985).
183. Yamamoto,K. *et al.* The gene encoding the Ia-associated invariant chain is located on chromosome 18 in the mouse. *Immunogenetics* **21**, 83-90 (1985).
184. Claesson,L., Larhammar,D., Rask,L., & Peterson,P.A. cDNA clone for the human invariant gamma chain of class II histocompatibility antigens and its implications for the protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**, 7395-7399 (1983).
185. Barrera,C.A. *et al.* Polarized expression of CD74 by gastric epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* **53**, 1481-1489 (2005).
186. Steimle,V., Siegrist,C.-A., Mottet,A., Lisowska-Grospierre,B., & Mach,B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* **265**, 106-109 (1994).
187. Kolk,D.P. & Floyd-Smith,G. Induction of the murine class-II antigen-associated invariant chain by TNF-alpha is controlled by an NF-kappa B-like element. *Gene* **126**, 179-185 (1993).
188. Lenardo,M.J. & Baltimore,D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* **58**, 227-229 (1989).

189. Bertolino,P. *et al.* Correlation between invariant chain expression level and capability to present antigen to MHC class II-restricted T cells. *Int. Immunol.* **3**, 435-443 (1991).
190. Wright,K.L., Moore,T.L., Vilen,B.J., Brown,A.M., & Ting,J.P. Major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene expression is up-regulated by cooperative interactions of Sp1 and NF-Y. *J. Biol. Chem.* **270**, 20978-20986 (1995).
191. Brown,A.M. *et al.* Function of NF-kappa B/Rel binding sites in the major histocompatibility complex class II invariant chain promoter is dependent on cell-specific binding of different NF-kappa B/Rel subunits. *Mol. Cell Biol.* **14**, 2926-2935 (1994).
192. Zhu,L. & Jones,P.P. Transcriptional control of the invariant chain gene involves promoter and enhancer elements common to and distinct from major histocompatibility complex class II genes. *Mol. Cell Biol.* **10**, 3906-3916 (1990).
193. Moore,B.B. *et al.* The invariant chain gene intronic enhancer shows homology to class II promoter elements. *J. Immunol.* **161**, 1844-1852 (1998).
194. Warmerdam,P.A., Long,E.O., & Roche,P.A. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J. Cell Biol.* **133**, 281-291 (1996).
195. Yamamoto,K., Koch,N., Steinmetz,M., & Hammerling,G.J. One gene encodes two distinct Ia-associated invariant chains. *J. Immunol.* **134**, 3461-3467 (1985).
196. Strubin,M., Long,E.O., & Mach,B. Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs. *Cell* **47**, 619-625 (1986).
197. O'Sullivan,D.M., Noonan,D., & Quaranta,V. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J. Exp. Med.* **166**, 444-450 (1987).
198. Strubin,M., Berte,C., & Mach,B. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* **5**, 3485-3488 (1986).
199. Kampgen,E. *et al.* Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 3014-3018 (1991).
200. Roche,P.A., Marks,M.S., & Cresswell,P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* **354**, 392-394 (1991).
201. Anderson,H.A., Bergstrahl,D.T., Kawamura,T., Blauvelt,A., & Roche,P.A. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J. Immunol.* **163**, 5435-5443 (1999).
202. Roche,P.A. & Cresswell,P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345**, 615-618 (1990).
203. Koch,N., Lauer,W., Habicht,J., & Dobberstein,B. Primary structure of the gene for the murine Ia antigen-associated invariant chains (Ii). An alternatively spliced exon encodes a cysteine-rich domain highly homologous to a repetitive sequence of thyroglobulin. *EMBO J.* **6**, 1677-1683 (1987).

204. Stumptner-Cuvelette,P. & Benaroch,P. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim. Biophys. Acta* **1542**, 1-13 (2002).
205. Marks,M.S., Blum,J.S., & 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.* **111**, 839-855 (1990).
206. Roche,P.A., Marks,M.S., & Cresswell,P. Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* **354**, 392-394 (1991).
207. Bijlmakers,M.E., Benaroch,P., & Ploegh,H.L. Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J. Exp. Med.* **180**, 623-629 (1994).
208. Jasanooff,A., Park,S.J., & Wiley,D.C. Direct observation of disordered regions in the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9900-9904 (1995).
209. Park,S.J., Sadegh-Nasseri,S., & Wiley,D.C. Invariant chain made in Escherichia coli has an exposed N-terminal segment that blocks antigen binding to HLA-DR1 and a trimeric C-terminal segment that binds empty HLA-DR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11289-11293 (1995).
210. Bertolino,P. *et al.* Deletion of a C-terminal sequence of the class II-associated invariant chain abrogates invariant chains oligomer formation and class II antigen presentation. *J. Immunol.* **154**, 5620-5629 (1995).
211. Gedde-Dahl,M. *et al.* Exon 6 is essential for invariant chain trimerization and induction of large endosomal structures. *J. Biol. Chem.* **272**, 8281-8287 (1997).
212. Jasanooff,A., Wagner,G., & Wiley,D.C. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein II. *EMBO J.* **17**, 6812-6818 (1998).
213. Newcomb,J.R., Carboy-Newcomb,C., & Cresswell,P. Trimeric interactions of the invariant chain and its association with major histocompatibility complex class II alpha beta dimers. *J. Biol. Chem.* **271**, 24249-24256 (1996).
214. Ashman,J.B. & Miller,J. A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain. *J. Immunol.* **163**, 2704-2712 (1999).
215. Dixon,A.M., Stanley,B.J., Matthews,E.E., Dawson,J.P., & Engelmann,D.M. Invariant chain transmembrane domain trimerization: a step in MHC class II assembly. *Biochemistry* **45**, 5228-5234 (2006).
216. Kukol,A., Torres,J., & Arkin,I.T. A structure for the trimeric MHC class II-associated invariant chain transmembrane domain. *J. Mol. Biol.* **320**, 1109-1117 (2002).
217. Majera,D., Kristan,K.C., Neefjes,J., Turk,D., & Mihelic,M. Expression, purification and assembly of soluble multimeric MHC class II-invariant chain complexes. *FEBS Lett.* **586**, 1318-1324 (2012).
218. Sung,E. & Jones,P.P. The invariant chain of murine Ia antigens: its glycosylation, abundance and subcellular localization. *Mol. Immunol.* **18**, 899-913 (1981).
219. Kvist,S., Wiman,K., Claesson,L., Peterson,P.A., & Dobberstein,B. Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* **29**, 61-69 (1982).

220. Bijlmakers,M.-J.E., Benaroch,P., & Ploegh,H.L. Assembly of HLA DR1 molecules translated *in vitro*: Binding of peptide in the endoplasmic reticulum precludes association with invariant chain. *EMBO J.* **13**, 2699-2707 (1994).
221. Koch,N. *et al.* Stoichiometry of HLA class II-invariant chain oligomers. *PLoS. ONE.* **6**, e17257 (2011).
222. Rudensky,A.Y., Preston-Hurlburt,P., Hong,S.C., Barlow,A., & Janeway,C.A., Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**, 622-627 (1991).
223. Chicz,R.M. *et al.* Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogenous in size. *Nature* **358**, 764-768 (1992).
224. Naujokas,M.F. *et al.* T cell recognition of flanking residues of murine invariant chain-derived CLIP peptide bound to MHC class II. *Cell. Immunol.* 1998 Aug 25;188(1):49-54 **188**, 49-54 (1998).
225. Eastman,S. *et al.* A study of complexes of class II invariant chain peptide: Major histocompatibility complex class II molecules using a new complex-specific monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* **26**, 385-393 (1996).
226. 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.* **181**, 527-536 (1995).
227. Geluk,A., Van Meijgaarden,K.E., Drijfhout,J.W., & Ottenhoff,T.H. Clip binds to HLA class II using methionine-based, allele-dependent motifs as well as allele-independent supermotifs. *Mol. Immunol.* **32**, 975-981 (1995).
228. 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.* **181**, 677-683 (1995).
229. Liang,M.N., Beeson,C., Mason,K., & McConnell,H.M. Kinetics of the reactions between the invariant chain (85-99) peptide and proteins of the murine class II MHC. *Int. Immunol.* **7**, 1397-1404 (1995).
230. Lee,C. & McConnell,H.M. A general model of invariant chain association with class II major histocompatibility complex proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8269-8273 (1995).
231. Bangia,N. & Watts,T.H. Evidence for invariant chain 85-101 (CLIP) binding in the antigen binding site of MHC class II molecules. *Int. Immunol.* **7**, 1585-1591 (1995).
232. Avva,R.R. & Cresswell,P. In vivo and *in vitro* formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain derived peptides. *Immunity* **1**, 763-774 (1994).
233. Kropshofer,H., Vogt,A.B., Stern,L.J., & Hammerling,G.J. Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules. *Science* **270**, 1357-1359 (1995).
234. Siebenkotten,I.M., Carstens,C., & Koch,N. Identification of a sequence that mediates promiscuous binding of invariant chain to MHC class II allotypes. *J. Immunol.* **160**, 3355-3362 (1998).
235. Vogt,A.B. *et al.* Interference of distinct invariant chain regions with superantigen contact area and antigenic peptide binding groove of HLA-DR. *J. Immunol.* **155**, 4757-4765 (1995).

236. Stumptner,P. & Benaroch,P. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J.* **16**, 5807-5818 (1997).
237. Thayer,W.P., Ignatowicz,L., Weber,D.A., & Jensen,P.E. Class II-associated invariant chain peptide-independent binding of invariant chain to class II MHC molecules. *J. Immunol.* **162**, 1502-1509 (1999).
238. Amigorena,S., Drake,J.R., Webster,P., & Mellman,I. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* **369**, 113-120 (1994).
239. Castellino,F., Han,R., & Germain,R.N. The transmembrane segment of invariant chain mediates binding to MHC class II molecules in a CLIP-independent manner. *Eur. J. Immunol.* **31**, 841-850 (2001).
240. Elliott,E.A. *et al.* The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* **179**, 681-694 (1994).
241. Bonnerot,C. *et al.* Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* **13**, 934-944 (1994).
242. Stern,L.J. & Wiley,D.C. The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty ab heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* **68**, 465-477 (1992).
243. Cowan,E.P., Cummings,R.D., Schwartz,B.D., & Cullen,S.E. Analysis of murine Ia antigen glycosylation by lectin affinity chromatography. I-Ak alpha chain subspecies and beta chains are each glycosylated differently. *J. Biol. Chem.* **257**, 11241-11248 (1982).
244. Sant,A.J., Hendrix,L.R., Coligan,J.E., Maloy,W.L., & Germain,R.N. Defective intracellular transport as a common mechanism limiting expression of inappropriately paired class II major histocompatibility complex a\beta chains. *J. Exp. Med.* **174**, 799-808 (1991).
245. Schaiff,W.T., Hruska,K.A., McCourt,D.W., Green,M., & Schwartz,B.D. HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *J. Exp. Med.* **176**, 657-666 (1992).
246. Anderson,K.S. & Cresswell,P. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J.* **13**, 675-682 (1994).
247. Arunachalam,B. & Cresswell,P. Molecular requirements for the interaction of class II major histocompatibility complex molecules and invariant chain with calnexin. *J. Biol. Chem.* **270**, 2784-2790 (1995).
248. Marks,M.S., Germain,R.N., & Bonifacino,J.S. Transient aggregation of major histocompatibility complex class II chains during assembly in normal spleen cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 10475-10481 (1995).
249. Schaiff,W.T., Hruska,K.A., Bono,C., Shuman,S., & Schwartz,B.D. Invariant chain influences post-translational processing of HLA- DR molecules. *J. Immunol.* **147**, 603-608 (1991).

250. Anderson,M.S. & Miller,J. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2282-2286 (1992).
251. Viville,S. *et al.* Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* **72**, 635-648 (1993).
252. Bikoff,E.K. *et al.* Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med.* **177**, 1699-1712 (1993).
253. Romagnoli,P. & Germain,R.N. 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.* **180**, 1107-1113 (1994).
254. Busch,R., Cloutier,I., Sekaly,R.-P., & Hammerling,G.J. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **15**, 418-428 (1996).
255. Germain,R.N. MHC-dependant antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**, 287-299 (1994).
256. Castellino,F., Zappacosta,F., Coligan,J.E., & Germain,R.N. Large protein fragments as substrates for endocytic antigen capture by MHC class II molecules. *J. Immunol.* **161**, 4048-4057 (1998).
257. Kropshofer,H., Vogt,A.B., & Hammerling,G.J. 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* **92**, 8313-8317 (1995).
258. Bikoff,E.K., Germain,R.N., & Robertson,E.J. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* **2**, 301-310 (1995).
259. Zhong,G.M., Castellino,F., Romagnoli,P., & Germain,R.N. Evidence that binding site occupancy is necessary and sufficient for effective major histocompatibility complex (MHC) class II transport through the secretory pathway redefines the primary function of class II-associated invariant chain peptides (CLIP). *J. Exp. Med.* **184**, 2061-2066 (1996).
260. Rovere,P. *et al.* Dendritic cell maturation and antigen presentation in the absence of invariant chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 1067-1072 (1998).
261. Arneson,L.S. & Miller,J. Efficient endosomal localization of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes requires multimerization of the invariant chain targeting sequence. *J. Cell Biol.* **129**, 1217-1228 (1995).
262. Machamer,C.E. & Cresswell,P. Monensin prevents terminal glycosylation of the N- and O-linked oligosaccharides of the HLA-DR-associated invariant chain and inhibits its dissociation from the alpha-beta chain complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 1287-1291 (1984).
263. Schroder,K. *et al.* Control of glycosylation of MHC class II-associated invariant chain by translocon-associated RAMP4. *EMBO J.* **18**, 4804-4815 (1999).
264. Neumann,J., Schach,N., & Koch,N. Glycosylation signals that separate the trimerization from the mhc class II-binding domain control intracellular degradation of invariant chain. *J. Biol. Chem.* **276**, 13469-13475 (2001).

265. Sant,A.J., Schwartz,B.D., & Cullen,S.E. Identification of a new component in the murine Ia molecular complex. *J. Exp. Med.* **158**, 1979-1992 (1983).
266. Sant,A.J., Cullen,S.E., Giacoletto,K.S., & Schwartz,B.D. Invariant chain is the core protein of the Ia-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Exp. Med.* **162**, 1916-1934 (1985).
267. Giacoletto,K.S. *et al.* The human invariant chain is the core protein of the human class II-associated proteoglycan. *J. Exp. Med.* **164**, 1422-1439 (1986).
268. Miller,J., Hatch,J.A., Simonis,S., & Cullen,S.E. Identification of the glycosaminoglycan-attachment site of mouse invariant-chain proteoglycan core protein by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 1359-1363 (1988).
269. Naujokas,M.F., Morin,M., Anderson,M.S., Peterson,M., & Miller,J. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* **74**, 257-268 (1993).
270. Shi,X. *et al.* CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* **25**, 595-606 (2006).
271. Bénaroch,P. *et al.* How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* **14**, 37-49 (1995).
272. Davidson,H.W., Reid,P.A., Lanzavecchia,A., & Watts,C. Processed antigen binds to newly synthesized MHC class II molecules in antigen-specific B lymphocytes. *Cell* **67**, 105-116 (1991).
273. Bakke,O. & Dobberstein,B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* **63**, 707-716 (1990).
274. Simonsen,A., Momburg,F., Drexler,J., Hammerling,G.J., & Bakke,O. Intracellular distribution of the MHC class II molecules and the associated invariant chain (II) in different cell lines. *Int. Immunol.* **5**, 903-917 (1993).
275. Bremnes,B., Madsen,T., Gedde-Dahl,M., & Bakke,O. An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J. Cell Sci.* **107 ( Pt 7)**, 2021-2032 (1994).
276. Pond,L. *et al.* A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 19989-19997 (1995).
277. Pieters,J., Bakke,O., & Dobberstein,B. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell. Sci.* **106**, 831-846 (1993).
278. Teyton,L. *et al.* Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* **348**, 39-44 (1990).
279. West,M.A., Lucocq,J., & Watts,C. Antigen processing and class II MHC peptide-loading compartments in human B-lymphoblastoid cells. *Nature* **369**, 147-151 (1994).
280. Davidson,H.W. Direct transport of newly synthesized HLA-DR from the trans-Golgi network to major histocompatibility complex class II containing compartments (MIICS) demonstrated using a novel tyrosine-sulfated chimera. *J. Biol. Chem.* **274**, 27315-27322 (1999).

281. Benaroch,P. *et al.* How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J.* **14**, 37-49 (1995).
282. Roche,P.A., Teletski,C.L., Stang,E., Bakke,O., & Long,E.O. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8581-8585 (1993).
283. Wang,K., Peterson,P.A., & Karlsson,L. Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 17055-17060 (1997).
284. Saudrais,C. *et al.* Intracellular pathway for the generation of functional MHC class II peptide complexes in immature human dendritic cells. *J. Immunol.* **160**, 2597-2607 (1998).
285. Kang,S., Liang,L., Parker,C.D., & Collawn,J.F. Structural requirements for major histocompatibility complex class II invariant chain endocytosis and lysosomal targeting. *J. Biol. Chem.* **273**, 20644-20652 (1998).
286. Motta,A. *et al.* Structure-activity relationship of the leucine-based sorting motifs in the cytosolic tail of the major histocompatibility complex-associated invariant chain. *J. Biol. Chem.* **270**, 27165-27171 (1995).
287. Rodionov,D.G. & Bakke,O. Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J. Biol. Chem.* **273**, 6005-6008 (1998).
288. Hofmann,M.W. *et al.* The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J. Biol. Chem.* **274**, 36153-36158 (1999).
289. Liu,S.H., Marks,M.S., & Brodsky,F.M. 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.* **140**, 1023-1037 (1998).
290. McCormick,P.J., Martina,J.A., & Bonifacino,J.S. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 7910-7915 (2005).
291. Dugast,M., Toussaint,H., Dousset,C., & Benaroch,P. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J. Biol. Chem.* **280**, 19656-19664 (2005).
292. Caplan,S., Dell'Angelica,E.C., Gahl,W.A., & Bonifacino,J.S. Trafficking of major histocompatibility complex class II molecules in human B-lymphoblasts deficient in the AP-3 adaptor complex. *Immunol. Lett.* **72**, 113-117 (2000).
293. Sevilla,L.M., Richter,S.S., & Miller,J. Intracellular transport of MHC class II and associated invariant chain in antigen presenting cells from AP-3-deficient mocha mice. *Cell Immunol.* **210**, 143-153 (2001).
294. Neefjes,J.J. & Ploegh,H.L. Inhibition of endosomal proteolytic activity by leupeptin blocks surface expression of MHC class II molecules and their conversion to SDS resistance ab heterodimers in endosomes. *EMBO J.* **11**, 411-416 (1992).
295. Loss,G.E.Jr. & Sant,A.J. Invariant chain retains MHC class II molecules in the endocytic pathway. *J. Immunol.* **150**, 3187-3197 (1993).

296. Nguyen,Q.V. & Humphreys,R.E. Time course of intracellular associations, processing, and cleavages of II forms and class II major histocompatibility complex molecules. *J. Biol. Chem.* **264**, 1631-1637 (1989).
297. Zachgo,S., Dobberstein,B., & Griffiths,G. A block in degradation of MHC class II-associated invariant chain correlates with a reduction in transport from endosome carrier vesicles to the prelysosome compartment. *J. Cell Sci.* **103** ( Pt 3), 811-822 (1992).
298. Blum,J.S. & Cresswell,P. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 3975-3979 (1988).
299. Blum,J.S. & Cresswell,P. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3975-3979 (1988).
300. Maric,M.A., Taylor,M.D., & Blum,J.S. Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2171-2175 (1994).
301. Honey,K. & Rudensky,A.Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 472-482 (2003).
302. Riese,R.J. & Chapman,H.A. Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 107-113 (2000).
303. Nakagawa,T.Y. & Rudensky,A.Y. The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* **172**, 121-129 (1999).
304. Lennon-Dumenil,A.M., Bakker,A.H., Wolf-Bryant,P., Ploegh,H.L., & Lagaudriere-Gesbert,C. A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 15-21 (2002).
305. Deussing,J. et al. Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 4516-4521 (1998).
306. Villadangos,J.A., Riese,R.J., Peters,C., Chapman,H.A., & Ploegh,H.L. Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsins S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism. *J. Exp. Med.* **186**, 549-560 (1997).
307. Beers,C., Honey,K., Fink,S., Forbush,K., & Rudensky,A. Differential regulation of cathepsin S and cathepsin L in interferon gamma-treated macrophages. *J. Exp. Med.* **197**, 169-179 (2003).
308. Benavides,F. et al. The CD4 T cell-deficient mouse mutation nakt (nkt) involves a deletion in the cathepsin L (Ctsl) gene. *Immunogenetics* **53**, 233-242 (2001).
309. Nakagawa,T. et al. Cathepsin L: critical role in II degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-453 (1998).
310. Bromme,D., Li,Z., Barnes,M., & Mehler,E. Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry* **38**, 2377-2385 (1999).
311. Tolosa,E. et al. Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *J. Clin. Invest.* **112**, 517-526 (2003).

312. Hagemann,S. *et al.* The human cysteine protease cathepsin V can compensate for murine cathepsin L in mouse epidermis and hair follicles. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 775-780 (2004).
313. Riese,R.J. *et al.* Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J. Clin. Invest* **101**, 2351-2363 (1998).
314. Nakagawa,T.Y. *et al.* Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity*. **10**, 207-217 (1999).
315. Shi,G.P. *et al.* Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*. **10**, 197-206 (1999).
316. Martin,W.D. *et al.* H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* **84**, 543-550 (1996).
317. Wubbolds,R. *et al.* Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface. *J. Cell Biol.* **135**, 611-622 (1996).
318. Shi,G.P. *et al.* Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J. Exp. Med.* **191**, 1177-1186 (2000).
319. Wang,B. *et al.* Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization. *J. Biol. Chem.* **273**, 32000-32008 (1998).
320. Santamaria,I., Velasco,G., Pendas,A.M., Paz,A., & Lopez-Otin,C. Molecular cloning and structural and functional characterization of human cathepsin F, a new cysteine proteinase of the papain family with a long propeptide domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 13800-13809 (1999).
321. Antoniou,A.N., Blackwood,S.L., Mazzeo,D., & Watts,C. Control of antigen presentation by a single protease cleavage site. *Immunity*. **12**, 391-398 (2000).
322. Manoury,B. *et al.* An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature* **396**, 695-699 (1998).
323. Manoury,B. *et al.* Destructive processing by asparagine endopeptidase limits presentation of a dominant T cell epitope in MBP. *Nat. Immunol.* **3**, 169-174 (2002).
324. Manoury,B. *et al.* Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone. *Immunity*. **18**, 489-498 (2003).
325. Hsieh,C.S., DeRoos,P., Honey,K., Beers,C., & Rudensky,A.Y. A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *J. Immunol.* **168**, 2618-2625 (2002).
326. Kovats,S. *et al.* Invariant chain-independent function of H-2M in the formation of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes in vivo. *J. Exp. Med.* **187**, 245-251 (1998).
327. Barton,G.M. & Rudensky,A.Y. Requirement for diverse, low-abundance peptides in positive selection of T cells. *Science* **283**, 67-70 (1999).
328. Fineschi,B., Arneson,L.S., Naujokas,M.F., & Miller,J. Proteolysis of major histocompatibility complex class II- associated invariant chain is regulated by the alternatively spliced gene product, p41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10257-10261 (1995).

329. Peterson,M. & Miller,J. Antigen presentation enhanced by the alternatively spliced invariant chain gene product p41. *Nature* **357**, 596-598 (1992).
330. Arunachalam,B., Lamb,C.A., & Cresswell,P. Transport properties of free and MHC class II associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int. Immunol.* **6**, 439-451 (1994).
331. Coulombe,R. *et al.* Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.* **15**, 5492-5503 (1996).
332. McGrath,M.E. The lysosomal cysteine proteases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 181-204 (1999).
333. Ogrinc,T., Dolenc,I., Ritonja,A., & Turk,V. Purification of the complex of cathepsin L and the MHC class II-associated invariant chain fragment from human kidney. *FEBS Lett.* **336**, 555-559 (1993).
334. Guncar,G., Pungercic,G., Klemencic,I., Turk,V., & Turk,D. Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J.* **18**, 793-803 (1999).
335. Zavasnik-Bergant,V. *et al.* Inhibitory p41 isoform of invariant chain and its potential target enzymes cathepsins L and H in distinct populations of macrophages in human lymph nodes. *Immunology* **112**, 378-385 (2004).
336. Bevec,T., Stoka,V., Pungercic,G., Dolenc,I., & Turk,V. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J. Exp. Med.* **183**, 1331-1338 (1996).
337. Fineschi,B., Sakaguchi,K., Appella,E., & Miller,J. The proteolytic environment involved in MHC class II-restricted antigen presentation can be modulated by the p41 form of invariant chain. *J. Immunol.* **157**, 3211-3215 (1996).
338. Lennon-Dumenil,A.M. *et al.* The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L. *EMBO J.* **20**, 4055-4064 (2001).
339. Fiebiger,E. *et al.* Invariant chain controls the activity of extracellular cathepsin L. *J. Exp. Med.* **196**, 1263-1269 (2002).
340. Punturieri,A. *et al.* Regulation of elastinolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J. Exp. Med.* **192**, 789-799 (2000).
341. Felbor,U. *et al.* Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J.* **19**, 1187-1194 (2000).
342. Mihelic,M., Dobersek,A., Guncar,G., & Turk,D. Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **283**, 14453-14460 (2008).
343. Roche,P.A. & 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* **88**, 3150-3154 (1991).
344. Konce,C.H. & Bikoff,E.K. Dissecting MHC class II export, B cell maturation, and DM stability defects in invariant chain mutant mice. *J. Immunol.* **173**, 3271-3280 (2004).
345. Takaesu,N.T., Lower,J.A., Robertson,E.J., & Bikoff,E.K. Major histocompatibility class II peptide occupancy, antigen presentation, and CD4+ T cell function in mice lacking the p41 isoform of invariant chain. *Immunity* **3**, 385-396 (1995).

346. Serwe,M., Reuter,G., Sponaas,A., Koch,S., & Koch,N. Both invariant chain isoforms li31 and li41 promote class II antigen presentation. *Int. Immunol.* **9**, 983-991 (1997).
347. Battegay,M. *et al.* Antiviral immune responses of mice lacking MHC class II or its associated invariant chain. *Cell Immunol.* **167**, 115-121 (1996).
348. Topilski,I., Harmelin,A., Flavell,R.A., Levo,Y., & Shachar,I. Preferential Th1 immune response in invariant chain-deficient mice. *J. Immunol.* **168**, 1610-1617 (2002).
349. Wong,P. & Rudensky,A.Y. Phenotype and function of CD4<sup>+</sup> T cells in mice lacking invariant chain. *J. Immunol.* **156**, 2133-2142 (1996).
350. Tourne,S., Nakano,N., Viville,S., Benoist,C., & Mathis,D. The influence of invariant chain on the positive selection of single T cell receptor specificities. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1851-1856 (1995).
351. Naujokas,M.F. *et al.* Potent effects of low levels of MHC class II-associated invariant chain on CD4+ T cell development. *Immunity* **3**, 359-372 (1995).
352. Shachar,I., Elliott,E.A., Chasnoff,B., Grewal,I.S., & Flavell,R.A. Reconstitution of invariant chain function in transgenic mice *in vivo* by individual p31 and p41 isoforms. *Immunity* **3**, 373-383 (1995).
353. Wright,R.J., Bikoff,E.K., & Stockinger,B. The li41 isoform of invariant chain mediates both positive and negative selection events in T-cell receptor transgenic mice. *Immunology* **95**, 309-313 (1998).
354. Bloom,B.R. & Bennett,B. Mechanism of a reaction *in vitro* associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* **153**, 80-82 (1966).
355. Calandra,T., Bernhagen,J., Mitchell,R.A., & Bucala,R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* **179**, 1895-1902 (1994).
356. Onodera,S. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* **50**, 1437-1447 (2004).
357. Binsky,I. *et al.* IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 13408-13413 (2007).
358. Mitchell,R.A. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 345-350 (2002).
359. Bozza,M. *et al.* Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J. Exp. Med.* **189**, 341-346 (1999).
360. Bernhagen,J. *et al.* An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J. Exp. Med.* **183**, 277-282 (1996).
361. Bacher,M. *et al.* An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 7849-7854 (1996).
362. Meyer-Siegler,K. & Hudson,P.B. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology* **48**, 448-452 (1996).

363. Bando,H. *et al.* Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 389-396 (2002).
364. Nishihira,J. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **995**, 171-182 (2003).
365. Chesney,J. *et al.* An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol. Med.* **5**, 181-191 (1999).
366. Leng,L. *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* **197**, 1467-1476 (2003).
367. Marsh,L.M. *et al.* Surface expression of CD74 by type II alveolar epithelial cells: a potential mechanism for macrophage migration inhibitory factor-induced epithelial repair. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **296**, L442-L452 (2009).
368. Lue,H. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene* **26**, 5046-5059 (2007).
369. Mitchell,R.A., Metz,C.N., Peng,T., & Bucala,R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J. Biol. Chem.* **274**, 18100-18106 (1999).
370. Bernhagen,J. *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat. Med.* **13**, 587-596 (2007).
371. Takahashi,K. *et al.* Macrophage CD74 contributes to MIF-induced pulmonary inflammation. *Respir. Res.* **10**, 33 (2009).
372. Fan,H. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor and CD74 regulate macrophage chemotactic responses via MAPK and Rho GTPase. *J. Immunol.* **186**, 4915-4924 (2011).
373. Meyer-Siegler,K.L., Leifheit,E.C., & Vera,P.L. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells. *BMC. Cancer* **4**, 34 (2004).
374. Gore,Y. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *J. Biol. Chem.* **283**, 2784-2792 (2008).
375. Charo,I.F. & Ransohoff,R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* **354**, 610-621 (2006).
376. Balabanian,K. *et al.* The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 35760-35766 (2005).
377. Beider,K., Abraham,M., & Peled,A. Chemokines and chemokine receptors in stem cell circulation. *Front Biosci.* **13**, 6820-6833 (2008).
378. Schwartz,V. *et al.* A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett.* **583**, 2749-2757 (2009).
379. Schwartz,V. *et al.* Role for CD74 and CXCR4 in clathrin-dependent endocytosis of the cytokine MIF. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 435-449 (2012).

380. Lin,X. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor within the alveolar spaces induces changes in the heart during late experimental sepsis. *Shock* **24**, 556-563 (2005).
381. Coleman,A.M. *et al.* Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma angiogenic potential by macrophage migration inhibitory factor and its homolog, D-dopachrome tautomerase. *J. Immunol.* **181**, 2330-2337 (2008).
382. Lue,H., Dewor,M., Leng,L., Bucala,R., & Bernhagen,J. Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74. *Cell Signal.* **23**, 135-144 (2011).
383. Samitas,K., Lotvall,J., & Bossios,A. B cells: from early development to regulating allergic diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **58**, 209-225 (2010).
384. Cariappa,A. & Pillai,S. Antigen-dependent B-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 241-249 (2002).
385. Pillai,S., Cariappa,A., & Moran,S.T. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol. Rev.* **197**, 206-218 (2004).
386. Pillai,S. & Cariappa,A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 767-777 (2009).
387. Shachar,I. & Flavell,R.A. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science* **274**, 106-108 (1996).
388. Kenty,G. & Bikoff,E.K. BALB/c invariant chain mutant mice display relatively efficient maturation of CD4+ T cells in the periphery and secondary proliferative responses elicited upon peptide challenge. *J. Immunol.* **163**, 232-241 (1999).
389. Kenty,G., Martin,W.D., Van,K.L., & Bikoff,E.K. MHC class II expression in double mutant mice lacking invariant chain and DM functions. *J. Immunol.* **160**, 606-614 (1998).
390. Matza,D. *et al.* Invariant chain induces B cell maturation in a process that is independent of its chaperonic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 3018-3023 (2002).
391. Matza,D., Wolstein,O., Dikstein,R., & Shachar,I. Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAF(II)105-NF-kappaB-dependent transcription program. *J. Biol. Chem.* **276**, 27203-27206 (2001).
392. Starlets,D. *et al.* Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* **107**, 4807-4816 (2006).
393. Lantner,F. *et al.* CD74 induces TAp63 expression leading to B-cell survival. *Blood* **110**, 4303-4311 (2007).
394. Matza,D., Kerem,A., Medvedovsky,H., Lantner,F., & Shachar,I. Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity* **17**, 549-560 (2002).
395. Binsky,I. *et al.* TAp63 regulates VLA-4 expression and chronic lymphocytic leukemia cell migration to the bone marrow in a CD74-dependent manner. *J. Immunol.* **184**, 4761-4769 (2010).
396. Gordin,M. *et al.* c-Met and its ligand hepatocyte growth factor/scatter factor regulate mature B cell survival in a pathway induced by CD74. *J. Immunol.* **185**, 2020-2031 (2010).

397. Cohen,S. *et al.* The cytokine midkine and its receptor RPTPzeta regulate B cell survival in a pathway induced by CD74. *J. Immunol.* **188**, 259-269 (2012).
398. Lapter,S. *et al.* A role for the B-cell CD74/macrophage migration inhibitory factor pathway in the immunomodulation of systemic lupus erythematosus by a therapeutic tolerogenic peptide. *Immunology* **132**, 87-95 (2011).
399. Cohen,S. & Shachar,I. Cytokines as regulators of proliferation and survival of healthy and malignant peripheral B cells. *Cytokine* (2012).
400. Labrecque,N., Madsen,L., Fugger,L., Benoist,C., & Mathis,D. Toxic MHC class II beta chains. *Immunity* **11**, 515-516 (1999).
401. Madsen,L. *et al.* Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10338-10343 (1999).
402. Maehr,R., Kraus,M., & Ploegh,H.L. Mice deficient in invariant-chain and MHC class II exhibit a normal mature B2 cell compartment. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2230-2236 (2004).
403. Benlagha,K. *et al.* Mechanisms governing B cell developmental defects in invariant chain-deficient mice. *J. Immunol.* **172**, 2076-2083 (2004).
404. Barrera,C., Espejo,R., & Reyes,V.E. Differential glycosylation of MHC class II molecules on gastric epithelial cells: implications in local immune responses. *Hum. Immunol.* **63**, 384-393 (2002).
405. Hershberg,R.M. *et al.* Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest* **102**, 792-803 (1998).
406. Lawrence,I.C., Fiocchi,C., & Chakravarti,S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 445-456 (2001).
407. Jiang,Z., Xu,M., Savas,L., LeClair,P., & Banner,B.F. Invariant chain expression in colon neoplasms. *Virchows Arch.* **435**, 32-36 (1999).
408. Ishigami,S. *et al.* Invariant chain expression in gastric cancer. *Cancer Lett.* **168**, 87-91 (2001).
409. de Jong,Y.P. *et al.* Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat. Immunol.* **2**, 1061-1066 (2001).
410. Beswick,E.J., Pinchuk,I.V., Suarez,G., Sierra,J.C., & Reyes,V.E. Helicobacter pylori CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events. *J. Immunol.* **176**, 6794-6801 (2006).
411. Beswick,E.J. & Reyes,V.E. Macrophage migration inhibitory factor and interleukin-8 produced by gastric epithelial cells during Helicobacter pylori exposure induce expression and activation of the epidermal growth factor receptor. *Infect. Immun.* **76**, 3233-3240 (2008).
412. Young,A.N. *et al.* Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am. J. Pathol.* **158**, 1639-1651 (2001).

413. Datta,M.W., Shahsafaei,A., Nadler,L.M., Freeman,G.J., & Dorfman,D.M. Expression of MHC class II-associated invariant chain (Ii;CD74) in thymic epithelial neoplasms. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **8**, 210-215 (2000).
414. Leth-Larsen,R. *et al.* Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics.* **8**, 1436-1449 (2009).
415. Mizue,Y. *et al.* Quantitation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) using the one-step sandwich enzyme immunoassay: elevated serum MIF concentrations in patients with autoimmune diseases and identification of MIF in erythrocytes. *Int. J. Mol. Med.* **5**, 397-403 (2000).
416. Maharshak,N. *et al.* CD74 is a survival receptor on colon epithelial cells. *World J. Gastroenterol.* **16**, 3258-3266 (2010).
417. Stein,R. *et al.* Anti-Proliferative Activity of a Humanized Anti-CD74 Monoclonal Antibody, hLL1, on B-Cell Malignancies. *Blood*(2004).
418. Beswick,E.J. *et al.* Helicobacter pylori-induced IL-8 production by gastric epithelial cells up-regulates CD74 expression. *J. Immunol.* **175**, 171-176 (2005).
419. Beswick,E.J. *et al.* Helicobacter pylori binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect. Immun.* **73**, 2736-2743 (2005).
420. Boren,T., Falk,P., Roth,K.A., Larson,G., & Normark,S. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* **262**, 1892-1895 (1993).
421. Beswick,E.J. *et al.* The Helicobacter pylori urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect. Immun.* **74**, 1148-1155 (2006).
422. Kim,S.Y., Lee,Y.C., Kim,H.K., & Blaser,M.J. Helicobacter pylori CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8. *Cell Microbiol.* **8**, 97-106 (2006).
423. Kobayashi,M. *et al.* A distinctive set of genes is upregulated during the inflammation-carcinoma sequence in mouse stomach infected by Helicobacter felis. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 263-274 (2007).
424. Shmuely,H. *et al.* Relationship between Helicobacter pylori CagA status and colorectal cancer. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 3406-3410 (2001).
425. Infection with Helicobacter pylori. *IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum.* **61**, 177-240 (1994).
426. Lindstedt,R., Liljedahl,M., Peleraux,A., Peterson,P.A., & Karlsson,L. The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif. *Immunity* **3**, 561-572 (1995).
427. Marks,M.S. *et al.* A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the b chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J. Cell Biol.* **131**, 351-369 (1995).
428. Copier,J. *et al.* Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J. Immunol.* **157**, 1017-1027 (1996).
429. Pierre,P. *et al.* Invariant chain controls H2-M proteolysis in mouse splenocytes and dendritic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 1057-1062 (2000).
430. Lammermann,T. *et al.* Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* **453**, 51-55 (2008).

431. Vascotto,F. *et al.* The actin-based motor protein myosin II regulates MHC class II trafficking and BCR-driven antigen presentation. *J. Cell Biol.* **176**, 1007-1019 (2007).
432. Faure-Andre,G. *et al.* Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science* **322**, 1705-1710 (2008).
433. Stumptner-Cuvelette,P. *et al.* HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 12144-12149 (2001).
434. Keppler,O.T., Tibroni,N., Venzke,S., Rauch,S., & Fackler,O.T. Modulation of specific surface receptors and activation sensitization in primary resting CD4+ T lymphocytes by the Nef protein of HIV-1. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 616-627 (2006).
435. Schmokel,J. *et al.* Conservation of Nef function across highly diverse lineages of SIVsmm. *Retrovirology*. **6**, 36 (2009).
436. Schindler,M. *et al.* Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J. Virol.* **77**, 10548-10556 (2003).
437. Schindler,M., Wildum,S., Casartelli,N., Doria,M., & Kirchhoff,F. Nef alleles from children with non-progressive HIV-1 infection modulate MHC-II expression more efficiently than those from rapid progressors. *AIDS* **21**, 1103-1107 (2007).
438. Mitchell,R.S. *et al.* Competition model for upregulation of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain by human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol.* **82**, 7758-7767 (2008).
439. Toussaint,H. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 nef expression prevents AP-2-mediated internalization of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *J. Virol.* **82**, 8373-8382 (2008).
440. Kilareski,E.M., Shah,S., Nonnemacher,M.R., & Wigdahl,B. Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology*. **6**, 118 (2009).
441. Ghiglione,Y. *et al.* HIV-mediated up-regulation of invariant chain (CD74) correlates with generalized immune activation in HIV+ subjects. *Virus Res.* **163**, 380-384 (2012).
442. Hussain,A., Wesley,C., Khalid,M., Chaudhry,A., & Jameel,S. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation. *J. Virol.* **82**, 893-902 (2008).
443. Zhou,C., Lu,L., Tan,S., Jiang,S., & Chen,Y.H. HIV-1 glycoprotein 41 ectodomain induces activation of the CD74 protein-mediated extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway to enhance viral infection. *J. Biol. Chem.* **286**, 44869-44877 (2011).
444. Precio,H.A., Vander,H.N., Kosuri,K., Cresswell,P., & Ratner,L. Interaction of human immunodeficiency virus type 2 Vpx and invariant chain. *J. Virol.* **74**, 6168-6172 (2000).
445. Schutze,M.-P., Peterson,P.A., & Jackson,M.R. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **13**, 1696-1705 (1994).

446. Khalil,H. *et al.* The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int. Immunol.* **15**, 1249-1263 (2003).
447. Khalil,H., Brunet,A., & Thibodeau,J. A three-amino-acid-long HLA-DRbeta cytoplasmic tail is sufficient to overcome ER retention of invariant-chain p35. *J. Cell Sci.* **118**, 4679-4687 (2005).
448. Spiro,R.C. & Quaranta,V. The invariant chain is a phosphorylated subunit of class II molecules. *J. Immunol.* **143**, 2589-2594 (1989).
449. Anderson,H.A. & Roche,P.A. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J. Immunol.* **160**, 4850-4858 (1998).
450. Kuwana,T., Peterson,P.A., & Karlsson,L. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 1056-1061 (1998).
451. Newcomb,J.R. & Cresswell,P. Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J. Immunol.* **151**, 4153-4163 (1993).
452. Yan,G., Shi,L., Penfornis,A., & Faustman,D.L. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J. Immunol.* **170**, 620-627 (2003).
453. Narni,F. *et al.* HLA-DR-associated invariant chain is highly expressed in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **68**, 372-377 (1986).
454. Veenstra,H., Jacobs,P., & Dowdle,E.B. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* **82**, 2494-2500 (1993).
455. Honey,K., Forbush,K., Jensen,P.E., & Rudensky,A.Y. Effect of decreasing the affinity of the class II-associated invariant chain peptide on the MHC class II peptide repertoire in the presence or absence of H-2M. *J. Immunol.* **172**, 4142-4150 (2004).
456. Sadegh-Nasseri,S. & Germain,R.N. A role for peptide in determining MHC class II structure. *Nature* **353**, 167-170 (1991).
457. Germain,R.N. & Hendrix,L.R. MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* **353**, 134-139 (1991).
458. Beck,B.N. *et al.* Characterization of cell lines expressing mutant I-Ab and I-Ak molecules allows the definition of distinct serologic epitopes on A alpha and A beta polypeptides. *J. Immunol.* **136**, 2953-2961 (1986).
459. Nishizuka,Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693-698 (1984).
460. O'Kelly,I., Butler,M.H., Zilberberg,N., & Goldstein,S.A. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* **111**, 577-588 (2002).
461. Berland,R. & Wortis,H.H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 253-300 (2002).
462. Kleemann,R., Grell,M., Mischke,R., Zimmermann,G., & Bernhagen,J. Receptor binding and cellular uptake studies of macrophage migration inhibitory factor (MIF):

- use of biologically active labeled MIF derivatives. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 351-363 (2002).
463. Humbert,J., Motta,I., & Truffa-Bachi,P. TNP-LPS induces an IgG anti-TNP immune response in mice. *Cell Immunol.* **47**, 211-217 (1979).
464. Betts,M. et al. Lipopolysaccharide from Brucella abortus behaves as a T-cell-independent type 1 carrier in murine antigen-specific antibody responses. *Infect. Immun.* **61**, 1722-1729 (1993).
465. Bozzacco,L. et al. Mass spectrometry analysis and quantitation of peptides presented on the MHC II molecules of mouse spleen dendritic cells. *J. Proteome. Res.* **10**, 5016-5030 (2011).
466. Muixi,L. et al. Unraveling features of the natural MHC class II peptidome of skin-migrated dendritic cells. *Int. Immunol.* **24**, 59-69 (2012).
467. Bogunovic,B., Srinivasan,P., Ueda,Y., Tomita,Y., & Maric,M. Comparative quantitative mass spectrometry analysis of MHC class II-associated peptides reveals a role of GILT in formation of self-peptide repertoire. *PLoS. ONE.* **5**, e10599 (2010).
468. Tomonari,K., Fairchild,S., & Rosenwasser,O.A. Influence of viral superantigens on Vb- and Va-specific positive and negative selection. *Immunol. Rev.* **131**, 131-168 (1993).
469. Simpson,E. et al. T-cell receptor repertoire selection by mouse mammary tumor viruses and MHC molecules. *Immunol. Rev.* **131**, 93-115 (1993).
470. Huang,L.Y., van Meerwijk,J.P., Bikoff,E.K., & Germain,R.N. Comparison of thymocyte development in normal and invariant chain-deficient mice provides evidence that maturation-related changes in TCR and co-receptor levels play a critical role in cell fate. *Int. Immunol.* **8**, 1429-1440 (1996).
471. Thibodeau,J. et al. Subsets of HLA-DR1 molecules defined by SEB and TSST-1 binding. *Science* **266**, 1874-1878 (1994).
472. Lavoie,P.M., Thibodeau,J., Cloutier,I., Busch,R., & Sekaly,R.P. Selective binding of bacterial toxins to major histocompatibility complex class II-expressing cells is controlled by invariant chain and HLA-DM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6892-6897 (1997).
473. Azar,G.A. & Thibodeau,J. Human endogenous retrovirus IDDMK(1,2)22 and mouse mammary tumor virus superantigens differ in their ability to stimulate murine T cell hybridomas. *Immunol. Lett.* **81**, 87-91 (2002).
474. de,R.L. et al. Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* **185**, 1103-1114 (2002).
475. de,R.L. Animal models in the analysis of Candida host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 324-329 (2004).
476. Kozak,M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292 (1986).
477. Kozak,M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* **16**, 2482-2492 (1997).

## Annexe 1 : Article non discuté dans cette thèse

---

### **Unconventional Topology between the T-Cell Receptor and MHC Class II Molecule is Coerced by Mouse Mammary Tumor Virus Superantigens**

Jean-Simon Fortin,<sup>1, 2,\*</sup> Laetitia Genève,<sup>1,\*</sup> Naglaa H. Shoukry,<sup>3</sup> Georges A. Azar,<sup>1,5</sup> Younes Souheil,<sup>3</sup> Bader Yassine-Diab,<sup>3</sup> Rafick Pierre Sékaly,<sup>4</sup> Daved H. Fremont<sup>2</sup> and Jacques Thibodeau<sup>1¶</sup>

\* These authors contributed equally to this work

<sup>1</sup> Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie & Immunologie, Université de Montréal. Montréal, QC, Canada.

<sup>2</sup> Department of Pathology & Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, United States

<sup>3</sup> Département de Médecine, Université de Montréal and Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada.

<sup>4</sup> Division of Infectious Diseases, Vaccine and Gene Therapy Institute - Florida (VGTI-FL), Port Saint Lucie, FL, United States

**Keywords:** Mouse mammary tumor virus, superantigens, antigen presentation, MHC class II, T-cell receptor.

<sup>1</sup> **Corresponding author:** Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie & Immunologie, Université de Montréal, CP 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7  
Tel : (514) 343-6279; Fax: (514) 343-5701;

**Running title:** Functional analysis of the MMTV superantigen

<sup>5</sup> Present address: Axenis, centre de Biologie Integrative des Maladies Émergentes (BIME), Institut Pasteur, Paris, France

**Status :** Accepted after revision by the Journal of Immunology.

## **ABSTRACT**

Mouse mammary tumor virus (MMTV) superantigens (vSAGs) are notorious for defying structural characterization and a consensus has yet to be reached regarding their ability to bridge the T-cell receptor (TCR) to the major histocompatibility complex class II (MHCII). Indeed, conflicting evidence of vSAG binding to the MHCII  $\alpha$ ,  $\beta$  chains or peptide-binding groove exists in the literature. Furthermore, our group and others have described vSAG presentation to be influenced by the MHCII peptide repertoire. In the present study, we aimed to determine the topology of the vSAG-MHCII-TCR complex by examining the respective relation of vSAG7 with the MHCII chains, MHCII-associated peptide and TCR. We used various covalently linked peptide-MHCII complexes to demonstrate that vSAG presentation is tolerant to variation in the protruding side chains of the peptide, but sensitive to a protruding N-terminal extension. An original approach in which vSAG was covalently linked to either MHCII chain confirmed that maturing vSAG binds the MHCII  $\beta$  chain outside the peptide binding groove. However, MHCII point mutants indicated that

mature vSAG binds to the DR $\alpha$   $\alpha$ -helix lining the groove in a conformation-sensitive manner. Because both vSAG moieties are non-covalently associated after processing, these results suggest that vSAG crosslinks MHCII molecules. Comparing different T cell hybridomas, we identified key residues on the MHCII  $\alpha$  chain that are differentially recognized by the CDR3 $\beta$  when engaged by vSAG. Finally, we describe a highly conserved TGXY motif responsible for vSAG-mediated T cell activation. Our results reveal a novel SAG-MHCII-TCR architecture in which vSAGs coerce a near-canonical docking between MHCII and TCR that allows eschewing of traditional CDR3 binding with the associated-peptide in favor of MHCII  $\alpha$  chain binding. These findings fit a model in which TCR reactivity toward MHC is orchestrated by thymic selection and less so by evolutionary conserved motifs.

## **INTRODUCTION**

Superantigens (SAGs) are bacterial or viral proteins that have the ability to stimulate up to 20% of the total T cell population, bypassing conventional MHC class II (MHCII) antigen processing and presentation [1]. SAG-activated T cells undergo a strong proliferation phase that is followed by either anergy or deletion [2]. In contrast to canonical MHCII-TCR docking, which relies on the intimate binding of the complementary determining regions (CDRs) to the MHCII  $\alpha$ -helices and associated-peptide, TCR bridging to MHCII by SAGs relies on distinct strategies [3]. One the one side, they commonly bind to the TCR CDR2, framework region 3 (FR3) and hypervariable region (HV4) that are within a specific variable (V) family [4]. On the other side, they either bind i) the MHCII  $\alpha$  chain, ii) a binding interface composed of the MHCII  $\alpha$  chain and associated-peptide, iii) the MHCII  $\beta$  His81 residue through coordination of a zinc ion or iv) the entire MHCII membrane-distal surface spanning the  $\alpha$ ,  $\beta$  chain and the associated-peptide [4,5]. Moreover, a handful of SAGs have the ability to crosslink or oligomerize MHCII molecules by using both the MHCII

$\alpha$  and  $\beta$  chain binding sites [6]. SAGs of viral origin have yet to provide a clear picture in terms of their ability to compel such interactions.

The best-characterized viral SAGs (vSAG) are those encoded by the mouse mammary tumor viruses (MMTVs). MMTV, type B retroviruses mainly transmitted through milk, require the expression of vSAGs to complete their infection cycle [7]. The vSAGs allow polyclonal T lymphocyte expansion, providing B cell help and cytokine production leading to the establishment of a cell reservoir able to replicate the virus [8]. Contrary to other SAGs, vSAGs are produced by the host cell machinery and must undergo post-translational modifications in order to stimulate T cells [9]. First, a precursor polypeptide forming a type II transmembrane protein of 37 kDa is modified by the addition of up to five N-linked glycans [10]. Then, the 45 kDa glycoprotein transits to the Golgi where it is cleaved at two specific R-X-X-R dibasic motifs, resulting in the N-vSAG and C-vSAG (also called 18 kDa) moieties. After processing, both N- and C-terminal domains remain non-covalently associated and detached from the membrane [11]. This maturation allows cells to shed vSAGs, even if devoid of MHCII, a feature called paracrine transfer [12]. Finally, by binding both MHCII and TCR, the C-vSAG domain is responsible for cognate T cell stimulation [13,14]. Within this fragment is the most polymorphic region of the MMTV SAGs, the C-terminal 21 to 38 residues responsible for V $\beta$  specificity [7]. Extensive TCR mutagenesis has revealed that the TCR-binding site of C-vSAG includes the TCR V $\beta$  FR3 and HV4 [15–19]. Interaction with MHCII, in contrast, is puzzling and has been reasoned from competition experiments in which vSAG and the staphylococcal enterotoxin A (SEA) compete for binding on both the  $\alpha$  and  $\beta$  chains [12,20].

MHCII are highly polymorphic, membrane-bound glycoproteins that present peptides derived from lysosomal-degraded protein to CD4 $^{+}$  T cells [21]. During synthesis, MHCII bind the invariant chain (Ii), which acts as a scaffold to improve folding and target the complex to the endosomal/lysosomal compartments [22,23]. There, Ii is sequentially degraded until only the class II-associated invariant chain peptide (CLIP) portion remains in the MHCII peptide binding groove [24,25]. Next, HLA-DM, a non-classical MHCII molecule,

facilitates the exchange of CLIP for antigenic peptides [26,27]. These peptides, buried in the peptide-binding pocket, also expose a few protruding side chains, which are central to TCR recognition [28]. As opposed to the potent SAG-mediated T cell activation, a given peptide/MHCII complex (pMHCII) will only stimulate an estimated 0.001 % of the T cell repertoire [29].

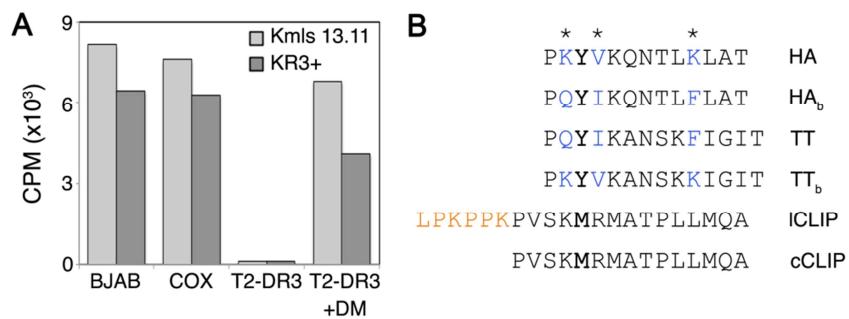
The molecular basis for successful T cell stimulation by vSAG7 is an interesting conundrum. Our group and others have described vSAG presentation to be influenced by the peptide repertoire [14,30,31]. However it is unknown whether this characteristic is linked to vSAG binding to MHCII or TCR recognition of the vSAG-bound MHCII complex. Conflicting evidence of vSAG binding to the MHCII  $\alpha$ ,  $\beta$  chains or peptide-binding groove exists in the literature and none provides a consensual model on how they successfully generate the T cell signaling complex [12,20,32,33]. In the present study, we aimed to determine the topology of the vSAG-MHCII-TCR complex by examining the respective relationship of vSAG7 with the MHCII chains, associated-peptide and TCR. To this end, we used a panel of covalently linked peptide-MHCII molecules, point mutants and MHCII-vSAG single chain (SC) constructs. Altogether, our results define a novel MHCII-SAG-TCR architecture.

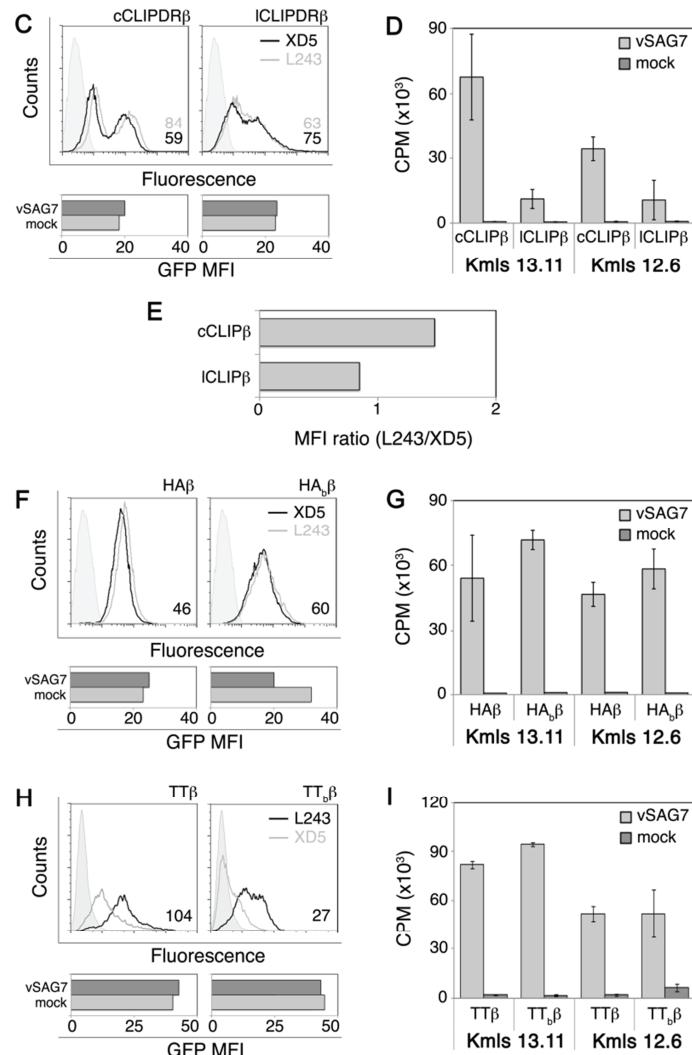
## **RESULTS**

### **The MHCII associated-peptide influences vSAG7 presentation**

It was previously shown that DM-deficient human cells could not present the toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) or vSAGs [31,34]. Similarly, presentation of these SAGs by cells from H2-DM-deficient mice was inefficient [35–37]. DM edits the peptide repertoire by exchanging CLIP for a variety of peptides with better kinetic stability [27]. Thus, we wondered whether the accumulation of CLIP-MHCII complexes observed in DM negative cells was responsible for the lack of vSAG7 presentation. We used the well-

characterized DM-negative T2-DR3 cell line [38]. In these cells, over 90% of the DR molecules are loaded with CLIP, a phenotype that is lost upon transfection of DM [39]. As shown in Figure 1A, whereas T2-DR3 cells failed to present vSAG7, T2-DR3-DM<sup>+</sup> cells led to strong T cell proliferation, similar to that observed with DM-proficient BJAB and COX B cell lines. Of note, in this experiment, vSAG was provided by co-culturing APCs with the class II-negative DAP-vSAG7+ cell line [12]. These results suggest that CLIP-DR3 complexes do not support vSAG7 presentation.





**Figure 1 : vSAG7 presentation is dictated by the MHCII associated-peptide.**

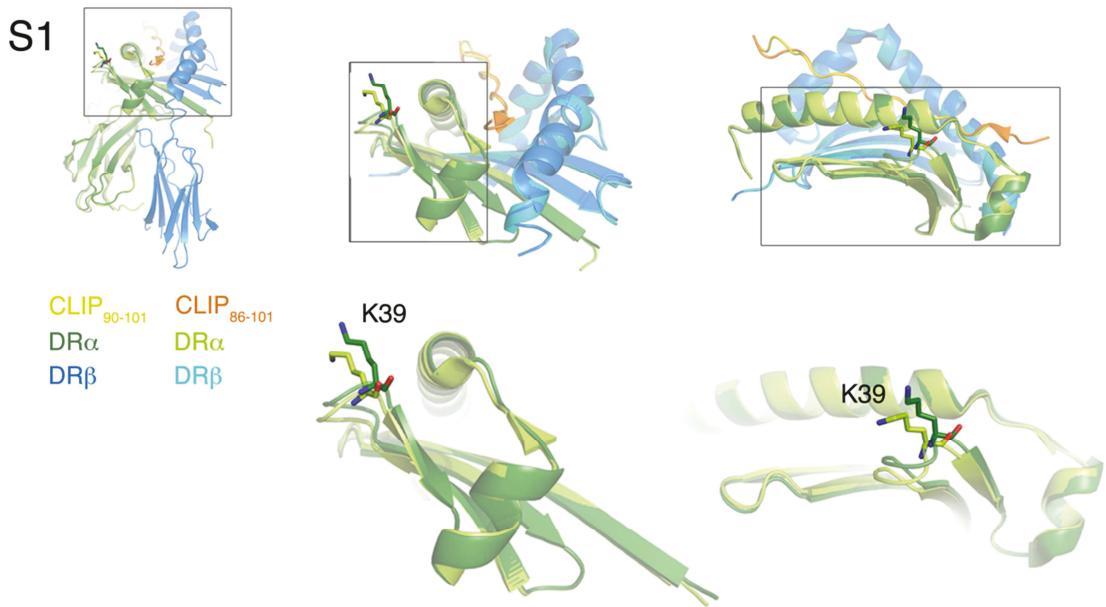
**A)** vSAG presentation by DM+ and DM- B cell lines following vSAG transfer from the vSAG7+ DAP cell line [12]. Presentation is monitored by the stimulation of V $\beta$ 6 and 8.1 bearing T cell hybridoma Kmls 13.11 and KR3+. BJAB (DR3) is used as a positive B cell control and COX is a DR3+DM+ B cell line. **B)** Sequence alignment of different peptide constructs covalently linked to DR $\beta$  used to assess vSAG presentation. Peptides are aligned according to the residue filling the P1 pocket. Asterisks above the sequences mark the protruding side chains at positions P-1, P2 and P8. MHCII cell surface expression of DAP cells transfected with DR $\alpha$  and cCLIP- or ICLIP- (**C**), HA- or HA $_b$ - (**F**), or TT- or TT $_b$ - (**H**) stained with either L243 or XD5 anti-DR mAbs. The MFI values for cell surface expression are shown in the lower right corner of each histogram and are colored according to the legend. Bar graphs below the histograms represent the MFI of the GFP control

plasmid co-transfected with vSAG7, to monitor the transfection efficiency. L243/XD5 MFI ratio of the two CLIP variants, cCLIP<sub>87-101</sub> and ICLIP<sub>81-101</sub> are shown in **E**. Transfected cell lines from **C, F** and **H** were used as APC to stimulate Kmls 13.11 or 12.6 hybridomas (**D, G** and **I**).

We next aimed to determine how the CLIP peptide could affect vSAG7 presentation. Considering the MHCII associated-peptide, vSAG presentation can be influenced by: i) the peptide's flanking residues (PFR) extending outside the groove, ii) the peptide's protruding side chains or iii) a peptide-induced MHCII conformational change. To discriminate between these possibilities, we generated cell lines displaying distinct homogenous pMHCII populations by transfecting DR $\alpha$  with various peptide-DR $\beta$  fusion proteins [40]. The mouse DAP cells were chosen as model APCs as they are easily transfected and allow vSAG7-specific T cell stimulation upon co-transfection of MHCII and vSAG [41]. Once stable peptide-DR1 DAP cell lines were obtained, we transiently transfected vSAG7 and monitored proliferation of mouse vSAG7-responsive T cell hybridomas [42]. We used two different hybridomas bearing V $\beta$ 6 regions cognate for vSAG7. Because vSAG7 expression is low, we co-expressed a reporter GFP to monitor transfection efficiencies and plotted MFI in bar graphs below or beside histograms of all cell lines.

Firstly, we tested whether the PFRs of CLIP were affecting vSAG stimulation. We hypothesized that the hallmark N-terminal extension of CLIP would affect vSAG7 presentation based on analyses of CLIP peptides found in T2-DR3 cells, which all bear 4 to 6 PFRs [43,44]. We generated cell lines expressing MHCIIIs charged with either longCLIP<sub>81-101</sub> or coreCLIP<sub>87-101</sub> peptides, herein named ICLIP and cCLIP, respectively (Fig. 1B). To ensure that the quaternary structure of the different complexes was not disturbed by the peptide, we used two different mAbs: L243, which binds a conformational epitope on DR $\alpha$  chain and XD5.117, which binds a linear epitope on DR $\beta$  chain [45,46]. Figure 1C shows for each cell line the MHCII cell-surface expression and the MFI of the reporter GFP (lower panels). Both cell lines expressed similar amount of MHCIIIs and were similarly receptive to DNA upon the subsequent transient transfection of vSAG7 and GFP.

After vSAG7 transfection, cells were incubated with the V $\beta$ 6<sup>+</sup> T cell hybridomas Kmls 13.11 or 12.6. As shown in Figure 1D, vSAG7 presentation by ICLIP-DR was inefficient compared to cCLIP-DR, the latter giving rise to strong T cell response. Interestingly, we also observed a decrease in L243 mAb reactivity with the ICLIP-DR1 transfectant (Fig. 1C), better portrayed by the graph in Figure 1E showing normalized MFI for L243 over XD5. The reduced L243 reactivity for ICLIP-MHCII complexes can either stem from an MHCII conformation alteration or steric hindrance between the CLIP<sub>81-86</sub> extension and L243. This result suggests that vSAG7 presentation is sensitive to variations in pMHCII that are also sensed by the mAb L243. However, it is hard to pinpoint whether it is one of these effects, or a combination of both, that account for the reduction in stimulatory capacity of vSAG7. On the one hand, it was reported that the L243-like 14-4-4S mAb, specific for mouse MHCII, competes against vSAG7 on I-E<sup>d</sup> [47]. Likewise, the *Staphylococcus* enterotoxin B (SEB), which binds to the MHCII  $\alpha$  chain and competes with L243, is also affected by ILCIP [48,49]. On the other hand, superimposition of the crystal structures of DR1 bound to either CLIP<sub>86-101</sub> or CLIP<sub>90-101</sub> showed conformational alteration in the loop connecting the third and forth strands of the MHCII  $\beta$ -sheet platform that includes lysine  $\alpha$ 39 (Fig. S1) [50].



**Figure S1 : Conformations changes between two CLIP-DR1 variants.**

Overlay of the crystal structure of DR1 bound to CLIP<sub>86-101</sub> or CLIP<sub>90-101</sub> (PDB: 3 PDO and 3 PGD, respectively) highlighting the conformational change of the loop connecting the third and forth stands of the  $\beta$ -sheet forming the MHCII peptide-binding groove. The regions of interest are boxed and the DR $\alpha$  K39 is shown as sticks.

Mutation of K39 abolishes L243 and SEB binding but does not affect vSAG presentation [51]. Therefore, although there is a known conformational change between the CLIP-MHCII variants, it is unlikely to affect vSAG7 presentation. Together these results suggest that the reduced vSAG7 stimulation observed when presented by ICLIP-DR1 is due to steric hindrance of vSAG7 by terminal PFRs of CLIP. Also, the above-described data corroborate the notion that vSAG7 binds to the MHCII  $\alpha$  chain [12].

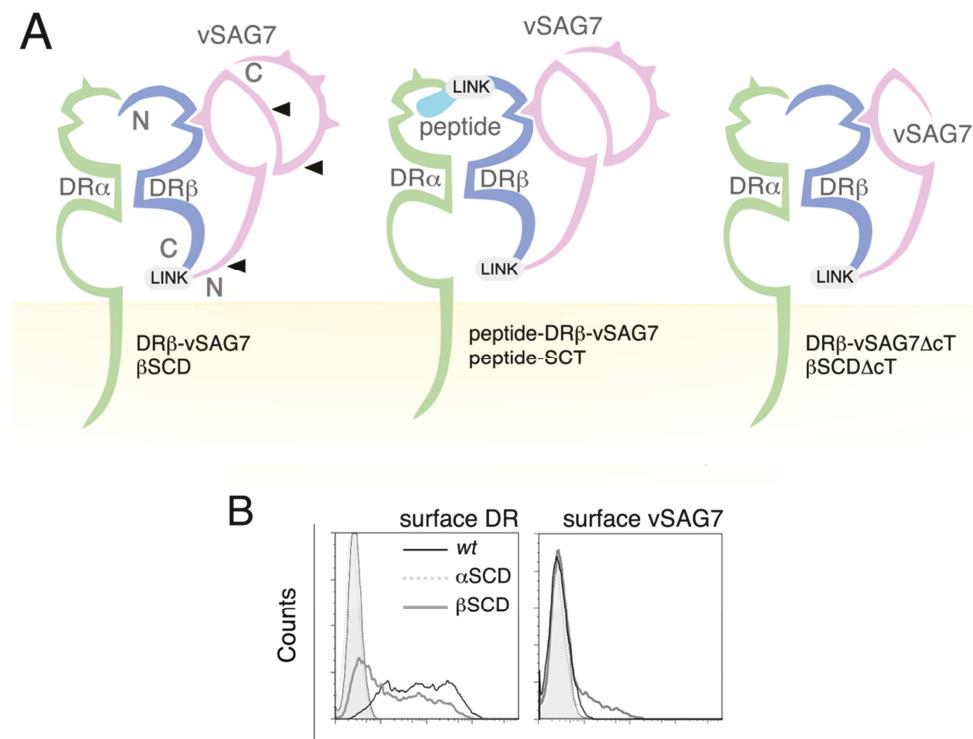
Secondly, we sought to evaluate the contribution of TCR-contacting peptide residues by comparing the capacity of peptides with distinct protruding side chains to present vSAG7. To this end, we employed a covalently linked hemagglutinin HA<sub>(307-319)</sub> peptide (HADR1). We selected this peptide over CLIP given the availability of the HA peptide-DR1-HA1.7 TCR structure and the responsive modified Jurkat cell line expressing the HA1.7 TCR (thereafter simply referred to Jurkat) [52,53]. Our rationale was

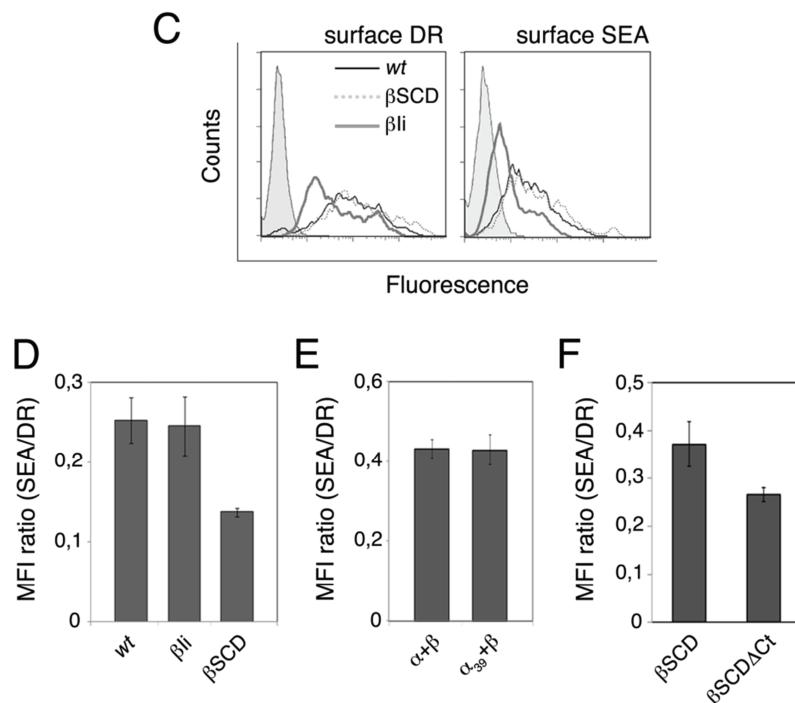
to be able to distinguish both the conventional and vSAG presentation in the same setting, using different T cells. In addition, to minimize adverse effects linked to the bound-peptide's primary sequence, we performed the same assays using another peptide supporting vSAG presentation, the tetanus toxin peptide (TT<sub>829-842</sub>). Like the HA-DR1, TT-DR1 has great kinetic stability and also fills the P1 pocket with a tyrosine, thus providing a system to test the exclusive contribution of peptide protruding side chains (Fig. 1B) [54,55]. The TCR contacting side chains of these two peptides were interchanged, resulting in the backbone (b) HA<sub>b</sub> and TT<sub>b</sub> variants, and involved a charge reversal at P-1 (K-Q), a change of a small residue (V) to a bulkier one (I) at P2, and finally a change from a negatively charged residue to a highly hydrophobic one (K-F) at P8. If any of the peptide protruding side chains were implicated in specific vSAG7 contacts, one should expect to see differential stimulation between these peptides, independently of the T cell V $\beta$  specificity. The stably transfected HA $\beta$  and TT $\beta$  constructs (Fig. 1F, H) were then tested for their capacity to stimulate T cells (Fig. 1G, I). Every variant successfully presented vSAG7, suggesting that a peptide's protruding side chains are not critical for vSAG7-mediated response (Fig. 1G, I). Conversely, presentation of HA<sub>b</sub> failed to stimulate Jurkat T cells (data not shown) as specific TCR contact residues have been modified [52]. All covalently-linked peptides (except ICLIP) supported strong vSAG7 presentation, ruling out a role for the peptide's C-terminal linker and thus, PFR at this end. Altogether, these results suggest a model in which vSAG7 presentation is tolerant to the nature of the peptide's protruding side chains, but sensitive to peptides bearing an N-terminal extension.

#### **N-vSAG7 has an overlapping binding site with SEA on the DR $\beta$ chain**

The above-described data support the notion that C-vSAG7 binds to the MHCII  $\alpha$  chain. However, it has been proposed that the vSAG7 polypeptide has two binding site on MHCII, one of which shares the same interface as SEA on the  $\beta$  chain or binds the peptide-

binding groove [20,32,33]. Maturing vSAGs are composed of two domains that remain non-covalently associated upon processing. C-vSAG participates in MHCII-TCR bridging but the role of N-vSAG is less clear. To gain insight on the role of the latter, we designed two single chain polypeptides in which the luminal domain of either DR chain is linked to that of vSAG7. These straightforward single chain dimers (SCDs) were inspired by a similar SC between MHCII and Ii [56]. Such SCDs were made possible because HLA-DR and vSAG7 are type I and type II proteins, respectively, allowing fusion of the C-terminus of DR chains to the N-terminus of vSAG7. The resulting DR $\alpha$  and  $\beta$ -based fusion molecules were named  $\alpha$ SCD and  $\beta$ SCD, respectively and are depicted in Figure 2A. For brevity, when a SCD is mentioned in an experimental setting, it is always co-transfected with its matching complementary wild type DR chain partner, *e.g.* DR $\alpha$ + $\beta$ SCD is referred to  $\beta$ SCD.





**Figure 2 : The N-terminal domain of vSAG7 overlaps SEA binding site on the MHCII  $\beta$  chain.**

A) Schematic representations of SCD and SCT are shown. The C-terminus of DR1  $\alpha$  or  $\beta$  chains were covalently attached to the N-terminus of vSAG7 by flexible GLY-SER linker. In the SCT, a peptide was appended to the N-terminus of the  $\beta$  chain according to Kozono et. al [59]. The linkers between DR and either the peptide, vSAG7 or li are represented as light grey boxes. B) L243 and VS7 cell surface staining of HEK 293T cells transfected with the  $\alpha$ SCD or  $\beta$ SCD and the appropriate complementary DR chain or a wt DR and vSAG7 control. L243 and VS7 mAbs recognize a conformational epitope on DR $\alpha$  and the C-terminal end of vSAG7, respectively. C) HEK 293T cells were transiently transfected with wt DR and vSAG7, DR $\alpha$  and the vSAG7-SCDs or li- $\beta$ SCDs. 48h post-transfection, cells were harvested, split and incubated on ice with L243 or SEA for 3h. After washing, bound SEA was detected by flow cytometry using an anti-SEA mAb. These staining profiles are representative of at least five independent experiments. D) The MFI were plotted as a ratio where the error bars represent the standard deviation to the mean of three stainings on independent populations of transfected cells. E) Same as D, but using DR $\alpha$  K39A mutant, which prevents SEA binding to the  $\alpha$  chain. F) Same as D, but using a truncated version of the vSAG7-SCD $\Delta$ Ct, devoid of the C-terminal domain

First, we characterized the interaction between the SCDs and their complementary MHCII chain partner. For these experiments, we used HEK 293T cells given their high

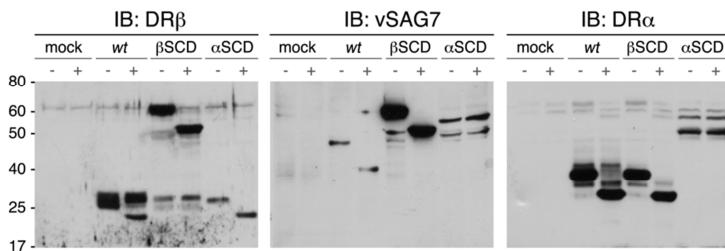
transfection efficiency. As shown in Figure 2B, the  $\alpha$ SCD apparently failed to associate with DR $\beta$  upon transfection, as judged by the lack of L243 surface staining and unusual degradation pattern (Fig. S2). In contrast, the  $\beta$ SCD properly associated into heterodimers with DR $\alpha$ , trafficked to the plasma membrane and was recognized by a panel of conformational mAbs (Fig. 2B and data not shown). Using the anti-C-vSAG7 mAb VS7, we also observed MHCII-bound vSAGs at the cell surface (Fig 2B, right panel). Altogether, these results indicate that only the  $\beta$ SCD can generate ordered complexes and allow vSAG surface expression.

Next, to confirm that vSAG7 behaved like the *wt* vSAG when part of the  $\beta$ SCD, we verified whether it still competed the binding of SEA. We transfected HEK 293T cells with either *wt* DR or  $\beta$ SCD and performed SEA binding assays monitored by flow cytometry.

Figure 2C shows the DR (left panel) and SEA (right panel) staining profiles, which reveal weak SEA binding to cells expressing  $\beta$ SCD. Once normalized for MHCII surface expression, we noted a two-fold MFI reduction for  $\beta$ SCD compared to the *wt* or  $\beta$ Ii-SCD controls (Fig. 2D). These results indicated that the vSAG moiety on DR $\beta$  prevented SEA binding. However, as SEA has a minor low affinity binding site on the MHCII  $\alpha$  chain, the possibility remained that the observed competition was due to the presence of vSAG7 on DR $\alpha$  [57,58]. To test this, we performed the same experiment using a DR $\alpha$  mutant that is unable to bind SEA (DR $\alpha$ K39A) [57]. As shown in Fig. 2E, competition is observed whether  $\beta$ SCD is associated with *wt* MHCII  $\alpha$  chain or K39A mutant. Moreover, truncating C-vSAG from  $\beta$ SCD, generating the  $\beta$ SCD $\Delta$ Ct, resulted in a similar reduction of SEA binding, confirming that N-vSAG7 and SEA have an overlapping binding interface (Fig. 2F).

The high SEA concentration and affinity for  $\beta$ His81 are factors likely to favor displacement of some of the vSAG7 molecules and could explain why competition was not total. Likewise, processing of the vSAG7 moiety is observed and could favor its dissociation from the  $\beta$  chain (Fig. S2). Also, one may argue that the mere fusion could affect DR conformation and lead to the decreased SEA binding. However, the tested conformational mAbs did not discriminate the SCD from the *wt* and both Ii-SCDs did not prevent SEA

binding (data not shown). These data confirmed that N-vSAG has an overlapping binding site with SEA on the MHCII  $\beta$  chain.



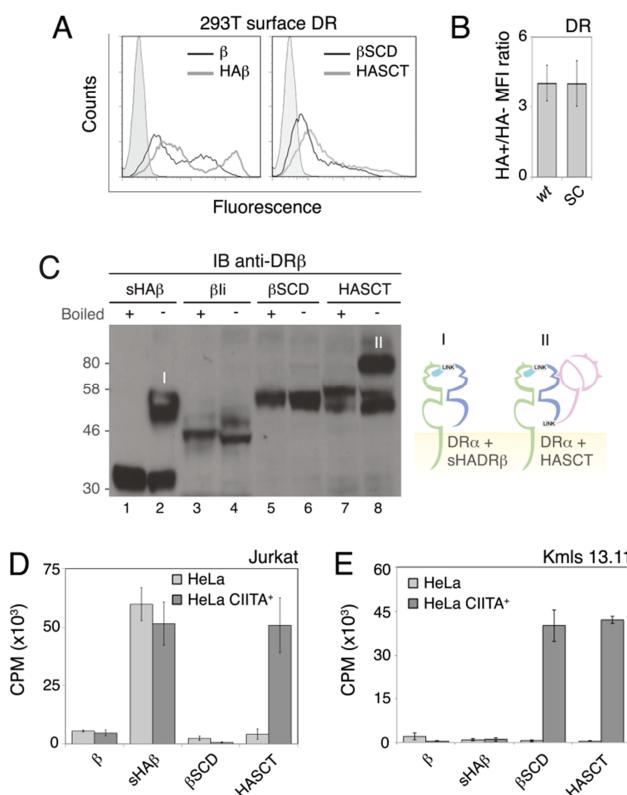
**Figure S2 : Maturation and proteolytic cleavage of the SCDS.**

Lysates of cells transfected with the  $\alpha$ SCD or  $\beta$ SCD and their respective complementary MHCII chains were split in two and treated or not with EndoH. Samples were separated by SDS-PAGE and immunoblotted for DR $\beta$ , vSAG7 or DR $\alpha$ . Control (untransfected or wt DR) and vSAG7 transfected cells were also given the same treatment. The molecular weight (kDa) is given on the left side and the + or - signs indicate whether EndoH treatment was performed.

#### vSAG7 does not bind the MHCII peptide groove

Our results described so far define the binding site of C-vSAG7 and N-vSAG to the MHCII  $\alpha$  and  $\beta$  chain, respectively. Thus, it was difficult to envision a model where vSAG7 interacted with both DR chains at once. The Huber group proposed that a segment of MMTV vSAGs (called the MIIPBM, MHCII peptide binding motif) interacts with the MHCII peptide-binding groove upon synthesis in the ER [33]. The CIIPBM motif is part of N-vSAG and could bridge both vSAG segments through the MHCII cleft. To verify whether vSAG7 occupies the MHCII groove, we designed a new construct, HA-single chain trimer (HASCT), in which the HA peptide was appended to the  $\beta$ SCD N-terminus (Fig. 2A). Based on the Hsu et al. premise, our rationale was that N-vSAG7 would prevent HA binding to the groove. Figure 3A shows the surface DR expression for both  $\beta$ SCD and HASCT in comparison to wt DR and HADR. Interestingly, DR surface staining was increased in both transfectants expressing the linked-HA peptide. These data corroborate well with the MHCII's increased stability when optimal peptide occupies the groove [59]. Soluble versions of DR $\beta$  and HA $\beta$

(s $\beta$  and sHA $\beta$ ) chains were used as controls and ruled out transmembrane (TM) domain-mediated bias between the TM-devoid  $\beta$ SCD and controls. L243 MFI ratios of s $\beta$  and  $\beta$ SCD against sHA $\beta$  and HASCT, respectively, showed a 4-fold increase in expression when HA was fused to DR $\beta$  (Fig. 3B). That the tethered HA peptide increased expression of DR is incompatible with a model in which vSAG would occupy the binding groove.



**Figure 3 : vSAG7 binding to MHCII  $\alpha$  and  $\beta$  chains occurs on distinct MHCII molecules.**

**A)** Cell surface expression of MHCII on HEK 293T cells transfected with DR or SCD (left panel) and HADR or SCT (left panel) stained with the L243 mAb. **C)** Compact SDS-resistant and -sensitive form of DR were assessed by immunoblot (IB) analysis of total protein extracts (boiled or heated to 65°C) from the transfectants in **A**. li-SCDs were used as control. The IB was revealed with the anti-DR $\beta$  mAb XD5. The two compact complexes are marked with I or II (lane 2 and 8) and schematized next to the gel. **D)** Comparison of HA-specific T cell stimulation between endogenous MHCII positive or negative HeLa cells transfected with different MHCII  $\beta$  chains. HeLa MHCII positive cells expressed DR2, contrary to the transfected DR1. **E)** Same as **D** but comparing vSAG7 specific T cell stimulation.

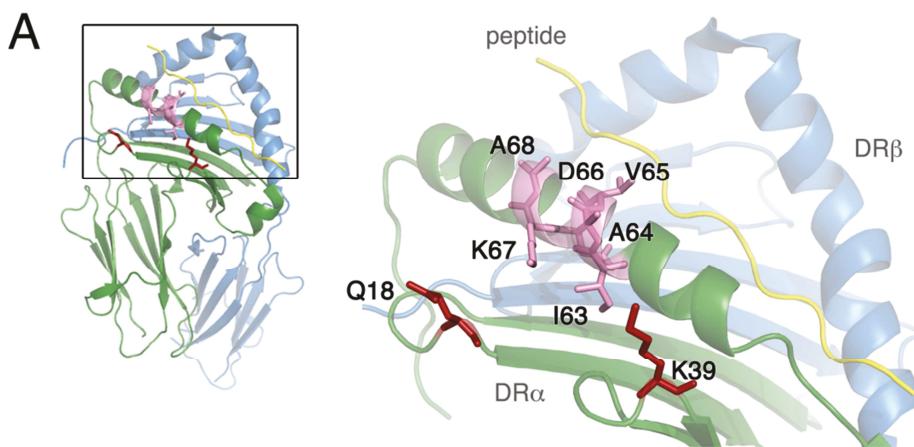
To confirm that the HA peptide was lodged inside the groove and not displaced by the immature vSAG7 polypeptide, we tested the complex for SDS sensitivity. Indeed, HA-DR1 complexes resist SDS-denaturation and migrate as compact peptide-loaded heterodimers under non-boiled conditions [60]. Cell lysates obtained from the transfectants presented in Figure 3A as well as a  $\beta$ Li-SCD control were analyzed by SDS-PAGE. XD5 mAb was used to probe the resulting immunoblots. As expected, in absence of HLA-DM, neither li- nor vSAG7- SCDs formed compact complexes with DR $\alpha$  (Fig. 3C, lane 4 and 6). In contrast, when HA was linked to either DR $\beta$  or  $\beta$ SCD (lane 2 and 8), compact, SDS-resistant heterodimers were observed, confirming that the HA-peptide was present in the groove.

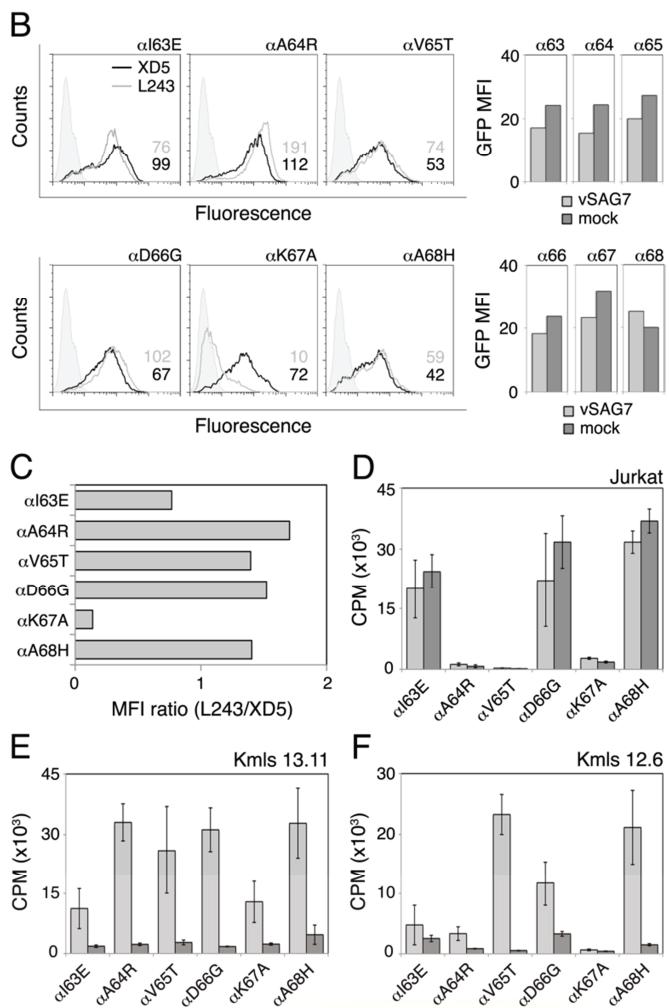
To unequivocally prove that vSAG7 did not bind to the MHCII cleft, we tested whether the HASCT could induce both Jurkat and vSAG-specific T cell responses. To this end, we moved from the HEK 293T to HeLa cells, the former being unable to present vSAG [31]. Of note, although the molecular basis of this defect remains obscure, HeLa cells are unable to present vSAGs unless transfected with CIITA or treated with IFN- $\gamma$  [31]. This provided a useful system to evaluate the presentation of HA independently of vSAG in absence of CIITA and of both HA and vSAG7 in the presence of CIITA. We transiently transfected our various  $\beta$  chains into either HeLa or HeLa CIITA+ cells and assessed the response of Jurkat or Kmls 13.11 cells. As expected, vSAG7 presentation only occurred in the presence of CIITA, whether from the SCD and SCT (Fig. 3E). Surprisingly, HeLa cells transfected with HASCT failed to stimulate Jurkat cells in contrast to the control sHA $\beta$  (Fig. 3D). The lack of HA presentation can be attributed to either an MHCII conformation flaw or to the vSAG moiety of the HASCT hampering proper TCR docking. We argue for the latter alternative because the tested mAbs did not distinguish the HASCT from the sHA $\beta$  control (Fig. 3A and data not shown) and in the presence of CIITA, HA presentation was restored (Fig. 3D). However, that Jurkat failed to respond to the HASCT in CIITA-negative

cells was puzzling. This is not due to degradation of the SCT-HA peptide and its subsequent association to endogenously expressed MHCIIIs as the DR $\beta^*$ 0102 allele in the homozygous HeLa CIITA+ cells does not present HA307-318 to Jurkat T cells [61] and therefore must arise from the HA-DR1 moiety of the SCT. One explanation is that in presence of a pool of MHCIIIs, C-vSAG is transferred from the processed SCT onto the endogenous pMHCIIIs (supporting vSAG presentation), thus revealing HA to the HA1.7 TCR bearing Jurkat T cells. The implications of this finding are discussed below

#### vSAG7 presentation relies on MHCII $\alpha$ -TCR interactions

To better pinpoint the C-vSAG7 binding site on DR $\alpha$  and investigate the TCR binding topology, we generated an array of mutants of the  $\alpha$ -helix lining the peptide groove. Most mutants were modeled from DQ2 and IA $^q$ , which present vSAG poorly and span aa63 to 68, the interface associated with SEB binding [7]. Figure 4A shows the point-mutants on the HA-DR1 cartoon depiction (Protein data base (PDB): 1FYT) as well as DR $\alpha$  residues implicated in L243 mAb binding [52,62].



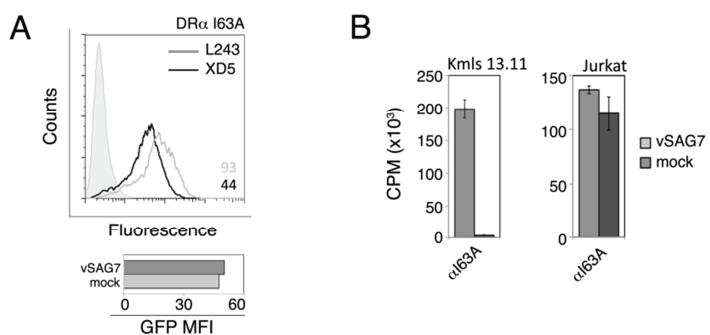


**Figure 4 : Residues on the MHCII  $\alpha$  chain act in tandem with vSAG to engage TCRs.**

A) Cartoon depiction of the MHCII with a close-up on the peptide-binding groove that highlights DR $\alpha$   $\alpha$ -helix spanning mutants (pink) and the L243 mAbs binding site (red), depicted as sticks. The  $\alpha$ ,  $\beta$  chains and peptide are green, blue and yellow, respectively. B) MHCII cell surface profiles of DAP cell lines transfected with HADR $\beta$  and different DR $\alpha$  mutants as stained with L243 and XD5 mAbs. The MFIs are shown in the lower right corner of each histogram and are colored according to the legend. Co-transfected GFP protein was used to monitor the transfection efficiency of vSAG7 and MFI are shown as bar graphs next to histograms. C) L243 and XD5 MFI ratios derived from B. Cell lines from B were transfected with vSAG7 or a mock control before monitoring Jurkat (D), Kmls 13.11 (E) and Kmls 12.6 (F) T cell proliferation.

Flow cytometry analysis of the resulting stable DR expression in DAP cells is given in Figure 4B assessed by L243 and XD5 staining. As above, stable cell lines were transiently co-transfected with vSAG7 and the reporter GFP. Then, cells were co-cultured with Kmls 13.11 and Kmls 12.6 T cells and IL-2 production was measured. In an effort to minimize the effect of the cells' intrinsic associated-peptides, we co-expressed each DR $\alpha$  variant with the HADR $\beta$  chain. In addition, this allowed us to monitor the stimulation of HA-specific Jurkat cells, which could be impeded by the  $\alpha$  chain mutations (Fig 4D). As predicted from the HA-DR1-HA1.7 TCR co-crystal [52], only mutation of TCR contact residues  $\alpha$ 64, 65 and 67 abrogated presentation of HA to Jurkat cells.

Noteworthy, the reactivity of L243 was strongly decreased towards DR mutants  $\alpha$ 63 and  $\alpha$ 67 (Fig. 4B). This is best portrayed by the bar graph in Figure 4C, showing L243 MFI over the MFI of the conformation-insensitive XD5 mAb. Surprisingly, those same DR mutants had a dramatically reduced ability to present vSAG7 (Fig. 4E and F) suggesting again overlapping binding regions between L243 and vSAG. As the side-chain of  $\alpha$ 63 points laterally, the weakened stimulation observed with both hybridomas by the  $\alpha$ I63E MHCII mutant cell line suggests that C-vSAG7 binding is somehow affected by this mutation. Indeed, a less obstructive mutation,  $\alpha$ I63A, restored vSAG7 stimulation (Fig. S3).



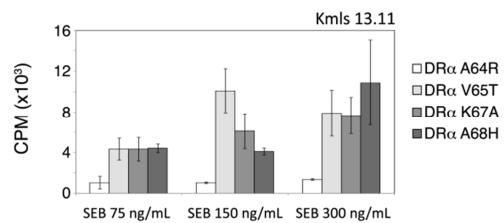
**Figure S3 : C-vSAG7 binding to the MHCII  $\alpha$  chain is conformation sensitive.**

A) Cell surface profiles of DAP cell lines expressing HADR $\beta$  and the I63A DR $\alpha$  mutant stained with the L243 and XD5 mAb. The MFI are shown in the lower right corner of each histogram and are colored with respect to the legend. Co-transfected YFP protein was used to monitor the transfection efficiency of vSAG7 and MFI are shown as bar graphs below histograms. B) Cell lines

from A were transfected with vSAG7 or a mock control before monitoring Kmls 13.11 and Jurkat T cell proliferation.

Interestingly, while DR $\alpha$ A64R allowed a strong Kmls 13.11 stimulation, Kmls 12.6 failed to respond (Fig. 4E and F). This result indicates a TCR recognition effect unrelated to vSAG7 binding and highlights the importance of specific DR $\alpha$ -TCR contacts for efficient T cell stimulation. In line with this, it became difficult to evaluate whether the effect of DR $\alpha$  K67A on vSAG presentation is actually linked to a weakened association between vSAG and DR $\alpha$  or to a TCR recognition defect. Indeed, DR $\alpha$  K67 is characterized by a lack of both L243 reactivity and inefficient presentation of HA peptide to Jurkat cells, making both outcomes plausible (Fig. 2C and D). Although weak, the stimulatory response observed exclusively with the Kmls 13.11 hybridoma suggests that TCR recognition is a factor.

The solvent exposed DR $\alpha$   $\alpha$ -helix is used by SEB to bridge TCRs [63]. The fact that vSAG7 presentation implicates DR $\alpha$ -TCR interactions demonstrates that the topology of the ternary complex is different from the one involving SEB. Interestingly, only the DR $\alpha$  mutant A64R cell line was unable to support SEB presentation (Fig. S4). The highly conserved A64 is buried inside the SEB-DR $\alpha$  interface and the Arg substitute is likely to sterically hinder SEB association, probably reflecting the effect of I63E on vSAG7 presentation. Overall, it is apparent that the mechanism leading to TCR recognition of the vSAG-MHCII complexes differs from SEB and canonical peptide-MHCII recognition.

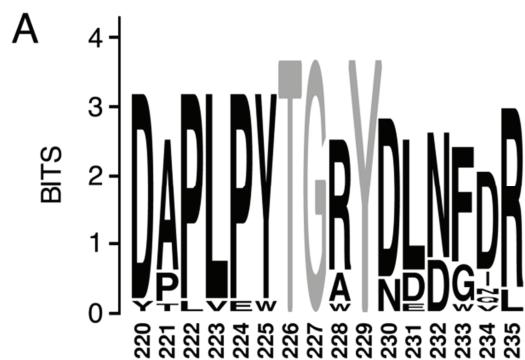


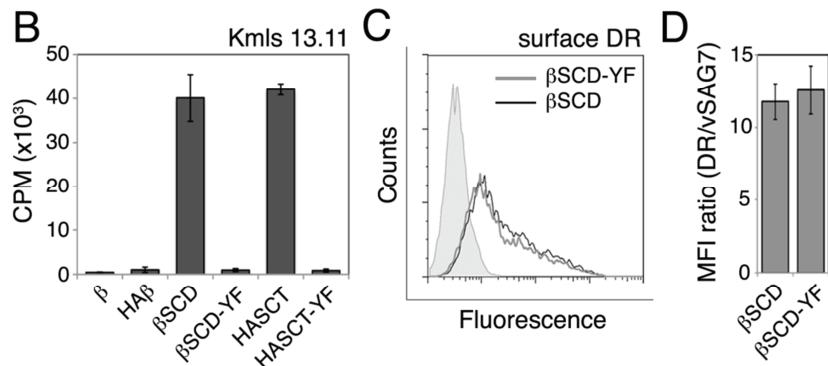
#### **Figure S4 : Effect of DR1 $\alpha$ mutant on SEB presentation.**

SEB presentation to Kmls 13.11 T cell hybridoma of multiple DR $\alpha$  mutant cell lines.

## vSAG7 mediates TCR activation through a conserved T-G-X-Y motif

The specific interactions between the TCR and the MHCII  $\alpha$  chain suggest the existence of conserved vSAG-TCR contacts. Given the numerous responsive V $\beta$ s for all vSAGs, it is unlikely that the TCR interaction is solely based on the polymorphic vSAG C-terminus as it would severely impede the likelihood of a cognate partnership. Interestingly, an alignment of MMTV SAGs and MMTV SAG-related domain from other viruses (e.g. herpesvirus) revealed a conserved T-G-X-Y motif (Fig. 5A), located at residues 226-229 of C-vSAG.





**Figure 5 : A conserved TGXY motif is central to vSAG7's activity.**

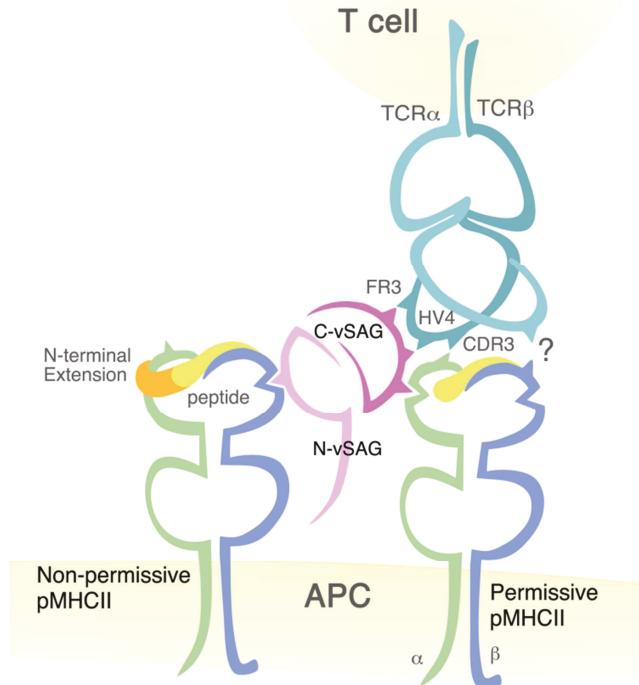
A) Sequence similarity among 18 MMTV vSAG proteins or vSAG-like domains. The height of a particular position is proportional to the frequency of the corresponding residue type between the aligned sequences and to the sequence information in the alignment and its given bits [112]. The residue numbering is based on the vSAG7 protein, genebank ID: M90535.1. The letters T, G and Y of the motif are colored a lighter shade of grey. B) Functional assay of transiently transfected HeLa CIITA cells with multiple  $\beta$  chains against the vSAG7-reactive Kmls 13.11 T cell hybridoma. C) L243 cell surface expression profiles of DR $\alpha$  transiently co-transfected with either the  $\beta$ SCD or the Y229F mutant. D) Ratios between DR and vSAG MFI were plotted from the transfectants in C and the error bars represent the standard deviation to the mean of three independent experiments.

Such a motif has been shown to be crucial for  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) binding to the GABAA receptor and mutagenesis analysis identified that GABA binding depends on the threonine and the tyrosine [64]. Based on this fact, we mutated the tyrosine 229 to a Phe and assessed the ability of vSAG7-YF to stimulate different T cell hybridomas. Figure 5B indicates that the Y229F mutation introduced either in full length or SC vSAG7 abrogated the activity. The TGXY motif could impact vSAG activity in many ways. On one hand, it could perturb C-vSAG binding to MHCIIIs or its overall structural integrity. Both these hypotheses are refuted by the fact that the mutation did not affect surface expression of MHCIIIs nor vSAG7 (Fig. 5C and D). On the other hand, the tyrosine 229 could be implicated in direct TCR contact. We argue for this explanation given that vSAG7-YF was unable to activate any of the tested T cells bearing either V $\beta$ 6 or V $\beta$ 8.1 TCRs (data not shown). Supporting this mechanism is the presence of a similar motif, LGNY, on a SEB

contacting loop that interacts with the HV4 region of the TCR $\beta$ . Accordingly, mutation of the Tyr on SEB prevents its presentation [65,66]. Furthermore, Digglemann and coworkers described the region of C-vSAG bearing the TGXY motif as part of the TCR-interacting domain [67]. These results suggest that in addition to highly polymorphic regions responsible for V $\beta$  specificities, vSAG binding also relies on conserved vSAG-specific TCR interactions.

## **DISCUSSION**

The data presented herein define how vSAG7 bridges MHCII to the TCR. C-vSAG binds the MHCII  $\alpha$  chain in a conformation-sensitive manner at the interface formed between the  $\alpha$ -helix and the  $\beta$ -sheet platform. We demonstrated that, when coerced by vSAG, the TCR recognizes the MHCII in a near canonical manner, which constitutes a unique topology among those previously described for SAGs. Next, our results suggest that maturing N- and C-vSAG7 bind the MHCII  $\beta$  and  $\alpha$  chains, respectively, on distinct MHCIIIs. Finally, we identified a conserved motif in MMTV vSAGs, responsible for TCR binding independently of the TCR V $\beta$  specificity. Based on our results and those of others, we propose a model in which the N- and C-terminal domains of a single vSAG crosslink two MHCIIIs and bridge only specific TCR bearing V $\beta$  elements that can be skewed as to recognize the MHCII  $\alpha$  chain instead of the associated-peptide (Fig. 6).



**Figure 6 : Model of vSAG7 binding to MHCII and TCR in which the multiple binding regions between vSAG7, both MHCII chains and the TCR are highlighted.**

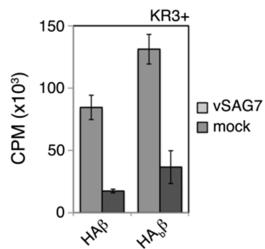
The N-vSAG and C-vSAG moieties remain non-covalently associated after processing and lead to the cross-linking of MHCII molecules. Binding of C-vSAG7 to the MHCII  $\alpha$  chain is conformation-dependent and abrogated by a peptide N-terminal extension. The TCR $\beta$  CDR3 binds the MHCII  $\alpha$  chain specifically instead of the peptide whereas vSAG binds the FR3 and HV4 region of the V $\beta$ . The exact nature of V $\alpha$  binding to the MHCII  $\beta$  remains to be fully characterized [111].

#### C-vSAG7 binding to the MHCII $\alpha$ chain is influenced by the associated-peptide

Presentation of vSAG7 requires that MHCII be filled with a diverse peptide repertoire [14,31,36]. Here, we demonstrated that a single peptide supports vSAG7 presentation. However, the MHCII associated-peptide must meet certain criteria in order to be part of a permissive pMHCII. By comparing cell lines expressing either cCLIP-DR1 or ICLIP-DR1, we showed that the CLIP81-86 PFR inhibits vSAG presentation (Fig. 1D). Interestingly, it was previously described that CLIP N-terminal extensions also interfered

with SEB binding to MHCII [49]. Based on the crystal structures of CLIP-DR3 and CLIP-I-Ab, the CLIP81-86 N-terminal extension is disordered thus failing to discern whether it prevents vSAG binding by steric hindrance, electrostatic repulsion or if this effect is a hallmark of the CLIP81-86 sequence [25,68]. Future studies will address this issue by characterizing the impact of N-terminal extensions on various peptides. Nevertheless, knowing the profound effect of PFRs on canonical and TSST-1 T cell responses [37,69,70], and that DM favors the binding of peptides that tightly fit the groove, our findings point to N-terminal peptide trimming as a major determinant for vSAG presentation [27,71]. These results explain why DM-deficient cells, either murine or human, are unable to present vSAG7 as they are predominantly charged with CLIP peptide bearing a 4-6 aa extension [43,44,72]. It was reported by Hsu et al. that a DM-negative B cell line was able to present vSAG7 [33]. However, as opposed to T2 cells expressing a single MHCII (DR3) or our DAP cell lines (DR1), the proportion of the various alleles of DR, DQ or DP that are bound to CLIP at steady state or which form of CLIP is bound is unclear in the DM- model.

It is unclear whether the previously reported need for peptide diversity reflects a direct contribution of the peptide's sequence to part of the vSAG binding site, or an indirect negative effect echoed in the MHCII conformation. The findings presented herein support the latter hypothesis. It is unlikely that vSAG7 interacts with the MHCII bound-peptide's protruding side chains because severe changes in charge or size between those of HA, TT and CLIP did not affect their ability to activate V $\beta$ 6 and V $\beta$ 8.1 bearing T cells (Fig. 1 and S5). While we did not conduct a thorough saturation mutagenesis of the peptides, our observation of DR $\alpha$ -TCR contacts portrays a setting in which vSAG7-peptide interactions are improbable (see below).

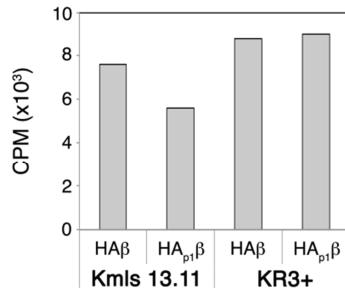


**Figure S5 : Peptide protruding side chains do not affect vSAG7 presentation.**

Transfected cell lines from Fig. 1F were used as APCs to stimulate V $\beta$ 8.1+ bearing T cell hybridoma KR3+.

Our results suggest that C-vSAG7 binds to the lateral interface formed by the solvent-exposed DR $\alpha$   $\alpha$ -helix/ $\beta$ -sheet junction (Fig. 4A), an area highly susceptible to peptide-induced conformational changes [73]. That HA-DR1 $\alpha$ I63E, but not HA-DR1 $\alpha$ I63A reduced L243 mAb reactivity and reduced vSAG7 presentation capabilities point to an MHCII conformation defect (Fig. 4C-D and S3). It was previously reported that mice expressing E $\alpha$ -bound I-Ab as the sole pMHCII were unable to mount vSAG7 specific responses, supporting the conclusion that a diverse MHCII peptide repertoire was required [36]. In light of our results, we can speculate as to why this pMHCII failed to present vSAG. The E $\alpha$ (52-68) peptide bears no N-terminal PFRs and the C-terminal linker between the peptide and the MHCII  $\beta$  chain does not influence vSAG presentation. Thus, as previously presented by the authors, the inability of E $\alpha$ -I-Ab to successfully present vSAG must be due to its intrinsic conformation [36]. Indeed, whereas the 25-9-17 mAb binds a panel of peptide-bound I-Ab, E $\alpha$ -I-Ab was not recognized [74,75]. One possibility is that vSAG7 binding is affected by the  $\alpha$ F24 residue, reported to be pushed outward by the bulky p1-filling Phe of E $\alpha$ , at the C-vSAG7 binding site [76]. While we did not observe an effect of a Y-A substitution at the p1 HA residue (Fig. S6), it would be interesting to determine if a bulkier aa (e.g. Trp) substitution would reduce vSAG7 presentation.

accordingly. Altogether, these results indicate that the interface formed on the DR $\alpha$   $\alpha$ -helix/ $\beta$ -sheet junction is paramount for vSAG7 binding and that its presentation is vulnerable to both peptide-mediated conformational changes and N-terminal PFRs.



**Figure S6 : Small peptide anchor residue substitution at p1 does not affect vSAG presentation.**  
DAP cell lines expressing DR $\alpha$  and HA $\beta$  or HA $_{p1}$  $\beta$  mutant Y-A were transfected with vSAG7 or a mock control prior to T cell presentation to the V $\beta$ 6 and V $\beta$ 8.1 bearing Kmls 13.11 or KR3+ T cell hybridomas, respectively. The HA $_{p1}$  $\beta$  mutant encodes a HA peptide with the Tyr P1 anchor residue mutated for an Ala.

#### TCR engagement by vSAG7 is unique among SAGs

Most of the SAG-mediated T cell signaling complexes outline a typical interaction between the TCR V $\beta$  and the SAG, where the V $\alpha$  sometimes participates in MHCII  $\beta$  chain binding [4,77,78]. Consequently, V $\beta$ -MHCII  $\alpha$  chain contacts are sterically precluded by the bound bacterial SAGs (bSAGs). Given the lack of an MMTV vSAG crystal structure, it is challenging to predict how vSAGs force MHCII-TCR association. Previous analyses of the response of mature peripheral T cells against vSAGs have clearly established that non-V $\beta$  components of the TCR are involved in the pMHCII-vSAG7 complex recognition [79–82]. The V $\alpha$  chain was shown to be an important part of the complex and a skewed repertoire in responding cells has been identified [83,84]. Within a given V $\alpha$  family, reactivity was seen with only certain V $\beta$  subfamily members [84,85]. Thus, the variations in the CDR regions, especially CDR3, are likely to affect the capacity of these TCRs to bind the MHCIIIs

and might be at the origin of many of the reported cases of MHCII allelic/isotype restriction [47,84,86,87].

Based on these facts and our results demonstrating that DR $\alpha$  A64R and K67A mutant cell lines differentially stimulated distinct hybridomas bearing the same V $\beta$ , it is clear that the TCR-MHCII contacts are imperative to vSAG7 signal transduction (Fig. 4E-F). Moreover, these findings highlight direct MHCII  $\alpha$  chain-TCR $\beta$  contacts and would imply that vSAG7-mediated TCR engagement resembles that of conventional peptides, as hypothesized by the Marrack and Kappler group following their discovery that the TCR  $\beta$ T24Y mutant abrogated both conventional Ag and vSAG presentation [15,88]. Along the same lines, our MHCII  $\alpha$  64 and 67 mutants were also unable to trigger HA-specific activation of Jurkat cells (Fig. 4D). Based on the crystal structure of HA-DR1-HA1.7 TCR, DR $\alpha$  A64 and K67 are bound to the CDR2 $\beta$  D51 [52]. However, one must be cautious in unifying these results. Indeed, as we have shown with our many different peptide-MHCII combinations, the peptide's protruding side chain did not affect vSAG response by the tested hybridomas, as would be expected in a traditional pMHCII-TCR setting (Fig. 1). Furthermore, mutations at residue  $\alpha$ 65 and  $\alpha$ 68, which are also implicated in TCR binding [52], had no effect on the ability of MHCIIIs to present vSAG7 (Fig. 4D and E). Thus, it is fitting to picture a near canonical docking between MHCII and TCR that is coerced by vSAG. Such architecture allows eschewing of traditional CDR1/3 binding with the associated-peptide in favor of MHCII chain binding as proposed by Nguyen et al. [89]. These Vo-MHCII $\beta$  and V $\beta$ -MHCII $\alpha$  contacts remain to be verified biochemically [90].

A large body of literature suggests that the  $\beta$  chain junctional region could influence TCR recognition of vSAGs [80,91–93]. Especially relevant was the demonstration by many groups that V $\beta$ 6 thymic deletion is incomplete in vSAG7+ mice and that V $\beta$  junctional diversity regulates vSAG reactivity [93,94]. At first glance, the need for a diverse peptide repertoire and the importance of V $\beta$  junctional diversity may seem paradoxical.

As many peptides support vSAG binding, we do not expect skewing in CDR3. However, our results point to the existence of non-permissive peptides regulating vSAG binding and to unconventional interactions between MHCII and TCR. In other words, there may be extra pressure on CDR3s to have more intimate contacts with the MHCII chains than during canonical peptide recognition. Indeed, thymic positive selection does not directly influence the fine specificity of T cells toward MHCII and it has been suggested that TCR/MHCII interactions taking place during vSAG presentation are unconventional and linked to TCR recognition of haplotype-specific MHCII residues [80,89]. This is in line with the recent demonstration by Kilgannon et al. that three out of eight V $\beta$ 6+ T cells, although all specific for the same pMHCII (K5-IAd), did not respond to vSAG7 [94].

A recent report by Stadinski et al. stresses the fact that TCR specificity for pMHC ligands is not driven by germline-encoded pairwise interactions. Notably, they described a single TCR V $\beta$  using alternate strategies to bind pMHC when paired with different V $\alpha$  [95]. The authors argue that since CDR1 and CDR2 loops have the flexibility to bind their ligands in many ways, this could not fit a pairwise co-evolution model. Accordingly, it demonstrated that the CDR3 loops can markedly alter those evolutionarily selected contacts [96]. Canonical CDR-pMHCII contacts can differ under different pressures, supporting a model in which vSAG enforces such unconventional docking.

### **vSAG7 moieties bind distinct MHCIIIs**

Given that vSAG7 N- and C-terminal moieties bind respectively the MHCII  $\beta$ 1 and  $\alpha$ 1 domains, one must ask how such binding is possible while remaining non-covalently associated. We propose a model where C-vSAG binds the  $\alpha$  chain of an adjacent MHCII, while still bound to N-vSAG, the latter attached to the  $\beta$  chain. In other words, unable to reach the  $\alpha$  chain of its MHCII partner in cis, C-vSAG interacts with another MHCII in trans. This model highly resembles the manner in which SEA crosslinks MHCII molecules via a low affinity binding site to the  $\alpha$  chain and the Zn-dependent binding site on the  $\beta$  chain [97,98]. In the context of the SCT, our results showing that HA presentation to Jurkat cells

is null in endogenous MHCII- as opposed to MHCII+ cell lines strongly support such a model (Fig. 3D). Indeed, we speculate that in the absence of surrounding endogenous pMHCIIs, both vSAG7 moieties remain associated with the parent MHCII, blocking the groove and preventing the TCR from recognizing the HA-peptide. Also, as each MHCII is covalently linked to vSAG, it is possible the C-vSAG prevents any approaching vSAG from contacting the  $\alpha$  chain in trans. In contrast, in Hela CIITA cells, C-vSAG7 will find numerous vSAG-free endogenous MHCII  $\alpha$  chains to associate with, freeing the MHCII membrane-distal region for the HA-1.7 TCR binding. Future studies will address the biochemical basis for vSAG binding to two distinct MHCII molecules.

#### **Highly conserved TCR binding motif in vSAGs**

Our results indicate a more intricate vSAG7 presentation than previously acknowledged. vSAG stimulatory activity is paired to the TCR interaction of DR $\alpha$ , a structural aspect that will likely modulate its potency in terms of the responding T cell repertoire and the strength of the signal. Additionally, vSAG recognition of specific TCR v $\beta$  elements is mediated through its C-terminal 30 or so highly variable aa, complicating speculation as to how this family of vSAGs could mediate such a broad immune response without a conserved binding scheme. Interestingly, the chemical baicalin (BA), shown to block GABA binding to its receptor in the nervous system, also blocked T cell stimulation by TSST and SEB, suggesting a conserved mechanism between those two bSAGs, MMTV vSAG and GABA neurotransmitter linked to the TGXY motif [99,100].

#### **Conclusion**

Our observation that conserved DR $\alpha$  residues are implicated in the recognition of the vSAG-peptide-MHCII by the TCR suggests that T cell activation is influenced by the polymorphic CDR3 $\beta$  region, linked to the recognition of the MHCII  $\alpha$  chain. To our

knowledge, this represents a novel SAG-mediated MHCII-TCR architecture. According to a recent study by Nur-ur Rahman et al. suggesting that the TCR CDR2 $\beta$  is the critical determinant for the functional recognition of bSAGs, it is clear that the topology of vSAG differs from those previously described [101]. As both the MHCII allele and associated-peptide influence the potential interaction between MHCII and TCR, a given TCR could only recognize a fraction of the vSAG-pMHCII complexes [80]. MMTV vSAGs are expressed at very low density on the cell surface and still remain highly potent T cell activators. This expression pattern is of great importance as it mimics the low density of conventional antigenic peptide-MHCII complexes, critical for T cell activation [102,103].

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Plasmids and mutagenesis*

The vSAG7 sequence was codon optimized using GeneOptimizer™ (Invotrogen). pBUD-DR $\alpha$ , and -DR $\beta$  have been described elsewhere [104]. Luminal portions of DR $\alpha$  (aa 1-191) and DR $\beta$  (aa 1-199) were linked to the luminal part of vSAG7 (aa 667-322) or li (aa 72-297) by the PCR overlap extension method [105]. The chains were joined by a small glycine-serine linker (G<sub>3</sub>.S-G<sub>3</sub>) introduced in DR chains, li and vSAG7 by complementary overlapping primers. DR $\alpha$  mutants, peptide-linked DR $\beta$  [59], HASCT, SCD $\Delta$ Ct and HASCT $\Delta$ Ct were generated by the PCR overlap extension method using the Phusion polymerase (NEB). The resulting cDNAs were cloned into pCDNA3 vector (Invitrogen, CA).

### *Antibodies and reagents*

The following antibodies were used: VS7 (mouse monoclonal antibody (mAb) IgG1 to the C-terminal end of MMTV7 SAG) [106], L-243 (mouse IgG2a mAb) and ISCR3 (mouse mAb IgG2b) bind a specific DR $\alpha$  conformational epitope [62], XD5 (mouse IgG1 mAb to a linear epitope in the  $\beta$ 1 domain of all class II molecules) [45], BU45 (mouse IgG1 mAb to the C-terminal portion of human li) [107] and CerCLIP.1 (mouse IgG1 mAb to the N-

terminal portion of CLIP) [108]. The anti-DR $\alpha$  (rabbit anti-serum against the DR $\alpha$  chain) and anti-DR $\beta$  (rabbit anti-serum against the DR $\beta$ \*0101 chain purified from SDS-PAGE; R.P. Sékaly, unpublished). The anti-SEA mAb was a kind gift of Dr W. Mourad (University of Montreal) [109]. SEA was purchased from Sigma Aldrich (St-Louis, MO).

#### *Cell lines and transfections*

Human epithelial HEK 293T, HeLa DM.5 and HeLa CIITA cells [31], and murine DAP cells were culture in DMEM (Wisent, Canada) with 5% fetal bovine serum (FBS; Wisent) while Kmls.13.11 and Kmls 12.6 T cell hybridomas [86] were cultured in DMEM with 10% FBS. CTL2-2 (ATCC TIB-214; American Type Culture Collection) and HA1.7 TCR+ Jurkat cell line, CH7C17 [53], were cultured in RPMI (Wisent, Canada) with 10% FBS and 4  $\mu$ M of  $\beta$ -mercaptoethanol. HeLa and DAP cells were transfected with the fusion proteins using lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The cells were selected for resistance against geneticin (500  $\mu$ g/mL; Wisent) and sorted by flow cytometry, using a FACSvantage SE (BD). HEK 293T cells were transfected using the calcium phosphate method as described previously [110] using 8  $\mu$ g of plasmid DNA. Cells were harvested and analyzed 48 h post-transfection.

#### *Flow cytometry*

Cells were incubated in PBS with the primary Ab for 30 min on ice. Cells were washed twice with PBS and incubated a further 30 min with the Alexa fluor-488-coupled goat anti-mouse IgG Ab (Invitrogen) for 30 min on ice. After two more washes, cells were analyzed by flow cytometry using a FACScalibur (BD biosciences). Alternatively, cells were incubated for 1 h with SEA on ice and washed twice with PBS prior to the addition of Abs.

Intracellular stainings were performed as mentioned on fixed, permeabilized cells (4% paraformaldehyde, 0.05% saponin).

#### *T cell stimulation assays*

vSAG7-expressing APCs were co-cultured at a 1:1 ratio with  $5 \times 10^4$  T cell hybridomas for 18h at 37°C. IL-2 production was determined by the ability of the co-culture supernatant to sustain the proliferation of the IL-2-dependent T cell line CTLL-2 and measured by [ $^3$ H]thymidine incorporation (47). For indirect presentation, APC (donors) were co-cultured with BJAB cells (acceptors) and responder T cell hybridomas at a ratio of 1:1:1.

#### *Immunoblot*

Stable or transfected cells were lysed for 30 min on ice at a density of  $2 \times 10^7$  cells per mL in 1% (v/v) Triton X-100 in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) and Complete Protease Inhibitor (Roche). Heated (65°C) or boiled total protein extracts were then separated by SDS-PAGE (10 %) under reducing conditions, unless mentioned otherwise. Samples were transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences). Membranes were blocked for 1 h with 5% (w/v) dry milk in TBS-T (TBS with 0.1% (v/v) Tween® 20). The following steps were also performed in TBS-T with 5% dry milk. Primary antibody to DR $\alpha$ , DR $\beta$  and vSAG7 were incubated for 1 h at room temperature. Membranes were washed three times for 10 min and incubated for 1 h with HRP-conjugated secondary antibodies (BIO/CAN Scientific) followed by three more 10-min washes. Bands were visualized by the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche). For endo H sensitivity, 500U of endoglycosidase H (NEB) were added to the protein extract and incubated for 1h at 37°C. Samples were analyzed on SDS-PAGE as above.

## Bibliography

1. Fraser JD, Proft T (2008) The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunological reviews* 225: 226–243.
2. Acha-Orbea H, Shakhov AN, Finke D (2007) Immune response to MMTV infection. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12: 1594–1609.
3. Scherer MT, Ignatowicz L, Winslow GM, Kappler JW, Marrack P (1993) SUPERANTIGENS: Bacterial and Viral protein that manipulate the Immune System. *AnnuRevCellBiol* 9: 101–128.
4. Sundberg EJ, Deng L, Mariuzza RA (2007) TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Semin Immunol* 19: 262–271.
5. Bueno C, Criado G, McCormick J, Madrenas J (2007) T cell signalling induced by bacterial superantigens. *Chem Immunol Allergy* 93: 161–180.
6. Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA (1999) The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annual Reviews of Immunology* 17: 435–466.
7. Acha-Orbea H, MacDonald HR (1995) Superantigens of mouse mammary tumor virus. *Annual Reviews of Immunology* 13: 459–486.
8. Ross SR (2010) Mouse mammary tumor virus molecular biology and oncogenesis. *Viruses* 2: 2000–2012.
9. Korman AJ, Bourgarel P, Meo T, Rieckhof GE (1992) The mouse mammary tumour virus long terminal repeat encodes a type II transmembrane glycoprotein. *EMBO Journal* 11: 1901–1905.
10. McMahon CW, Bogatzki LY, Pullen AM (1997) Mouse mammary tumor virus superantigens require N-linked glycosylation for effective presentation to T cells. *Virology* 228: 161–170.
11. Winslow GM, Marrack P, Kappler JW (1994) Processing and MHC binding of the MTV7 superantigen. *Immunity* 1: 23–33.
12. Delcourt M, Thibodeau J, Denis F, Sekaly RP (1997) Paracrine transfer of mouse mammary tumor virus superantigen. *Journal of Experimental Medicine* 185: 471–480.
13. Winslow GM, Marrack P, Kappler JW (1994) Processing and major histocompatibility complex binding of the MTV7 superantigen. *Immunity* 1: 23–33.
14. Grigg ME, McMahon CW, Morkowski S, Rudensky AY, Pullen AM (1998) Mtv-1 superantigen trafficks independently of major histocompatibility complex class II directly to the B-cell surface by the exocytic pathway. *JVirol* 72: 2577–2588.
15. Pullen AM, Bill J, Kubo RT, Marrack P, Kappler JW (1991) Analysis of the Interaction Site for the self superantigen Mls-1a on T cell receptor Vbeta. *Journal of Experimental Medicine* 173: 1183–1192.
16. Pullen AM, Wade T, Marrack P, Kappler JW (1990) Identification of the region of T cell receptor  $\alpha$  chain that interacts with the self-superantigen Mls-1a. *Cell* 61: 1365–1374.
17. Cazenave P a, Marche PN, Jouvin-Marche E, Voegtlé D, Bonhomme F, et al. (1990) V beta 17 gene polymorphism in wild-derived mouse strains: two amino acid substitutions in the V beta 17 region greatly alter T cell receptor specificity. *Cell* 63: 717–728.
18. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM (1991) SUPERANTIGENS: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annual Reviews of Immunology* 9: 745–772.
19. MacNeil D, Fraga E, Singh B (1992) Inhibition of superantigen recognition by peptides of the variable region of the T cell receptor  $\alpha$  chain. *European Journal of Immunology* 22: 937–941.
20. Torres BA, Griggs ND, Johnson HM (1993) Bacterial and retroviral superantigens share a common binding region on class II MHC antigens. *Bacterial and retroviral superantigens share a common binding region on class II MHC antigens. Nature* 364: 152–154.
21. Trombetta ES, Mellman I (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual review of immunology* 23: 975–1028.

22. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews Immunology* 11: 823–836.
23. Stumptner-Cuvelette P, Benaroch P (2002) Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim Biophys Acta* 1542: 1–13.
24. Blum JS, Cresswell P (1988) Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 3975–3979.
25. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC (1995) The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378: 457–462.
26. Kropshofer H, Hammerling GJ, Vogt AB (1999) The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunological Reviews* 172: 267–278.
27. Schulze M-SED, Wucherpfennig KW (2012) The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Current opinion in immunology* 24: 105–111.
28. Wang JH, Reinherz EL (2002) Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. *Mol Immunol* 38: 1039–1049.
29. Ford D, Burger D (1983) Precursor frequency of antigen-specific T cells: effects of sensitization in vivo and in vitro. *Cell Immunol* 79: 334–344.
30. Pullen A M, Bogatzki LY (1996) Receptors on T cells escaping superantigen-mediated deletion lack special beta-chain junctional region structural characteristics. *Journal of immunology* 156: 1865–1872.
31. Azar GA, Sekaly RP, Thibodeau J (2005) A defective viral superantigen-presenting phenotype in HLA-DR transfectants is corrected by CIITA. *Journal of Immunology* 174: 7548–7557.
32. Mottershead DG, Hsu PN, Urban RG, Strominger JL, Huber BT (1995) Direct binding of the Mtv7 superantigen (Mls-1) to soluble MHC class II molecules. *Immunity* 2: 149–154.
33. Hsu PN, Wolf Bryant P, Sutkowski N, McLellan B, Ploegh HL, et al. (2001) Association of mouse mammary tumor virus superantigen with MHC class II during biosynthesis. *Journal of immunology* 166: 3309–3314.
34. Lavoie PM, Thibodeau J, Cloutier I, Busch R, Sekaly RP (1997) Selective binding of bacterial toxins to major histocompatibility complex class II-expressing cells is controlled by invariant chain and HLA-DM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 6892–6897.
35. Tourne S, Miyazaki T, Oxenius A, Klein L, Fehr T, et al. (1997) Selection of a broad repertoire of CD4+ T cells in H-2Ma 0/0 mice. *Immunity* 7: 187–195.
36. Golovkina T, Agafonova Y, Kazansky D, Chervonsky a (2001) Diverse repertoire of the MHC class II-peptide complexes is required for presentation of viral superantigens. *Journal of immunology* 166: 2244–2250.
37. Hogan RJ, VanBeek J, Broussard DR, Surman SL, Woodland DL (2001) Identification of MHC class II-associated peptides that promote the presentation of toxic shock syndrome toxin-1 to T cells. *Journal of Immunology* 166: 6514–6522.
38. Mellins E, Smith L, Arp B, Cotter T, Celis E, et al. (1990) Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* 343: 71–74.
39. Denzin LK, Robbins NF, Carbov-Newcomb C, Cresswell P (1994) Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1: 595–606.
40. Ignatowicz L, Winslow G, Bill J, Kappler J, Marrack P (1995) Cell surface expression of class II MHC proteins bound by a single peptide. *Journal of Immunology* 154: 3852–3862.
41. Labrecque N, McGrath H, Subramanyam M, Huber BT, Sékaly RP (1993) Human T Cells Respond to Mouse Mammary Tumor Virus-encoded Superantigen: Vbeta Restriction and Conserved Evolutionary Features. *Biotechnology* 177: 1735–1743.
42. Subramanyam M, McLellan B, Labrecque N, Sekaly RP, Huber BT (1993) Presentation of the Mls-1 superantigen by human HLA class II molecules to murine T cells. *Journal of Immunology* 151: 2538–2545.
43. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P (1992) HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360: 474–477.

44. Sette a, Ceman S, Kubo RT, Sakaguchi K, Appella E, et al. (1992) Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen- processing mutant. *Science* 258: 1801–1804.
45. Radka SF, Machamer CE, Cresswell P (1984) Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and western blotting. *Human Immunology* 10: 177–188.
46. Gorga JC, Knudsen PJ, Foran JA, Strominger JL, Burakoff SJ (1986) Immunochemically purified DR antigens in liposomes stimulate xenogeneic cytolytic T cells in secondary in vitro cultures. *Cell Immunol* 103: 160–173.
47. Blackman MA, Lund FE, Surman S, Corley RB, Woodland DL (1992) Major histocompatibility complex-restricted recognition of retroviral superantigens by V beta 17+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 176: 275–280.
48. Sundberg E, Jardetzky TS (1999) Structural basis for the HLA-DQ binding by the streptococcal superantigen SSA. *Nature Structural Biology* 6: 123–129.
49. Vogt AB, Stern LJ, Amshoff C, Dobberstein B, Hammerling GJ, et al. (1995) Interference of distinct invariant chain regions with superantigen contact area and antigenic peptide binding groove of HLA-DR. *Journal of Immunology* 155: 4757–4765.
50. Günther S, Schlundt A, Sticht J, Roske Y, Heinemann U, et al. (2010) Bidirectional binding of invariant chain peptides to an MHC class II molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 22219–22224.
51. Thibodeau J, Labrecque N, Denis F, Huber BT, Sekaly RP (1994) Binding sites for bacterial and endogenous retroviral superantigens can be dissociated on major histocompatibility complex class II molecules. *Journal of Experimental Medicine* 179: 1029–1034.
52. Hennecke J, Carfi a, Wiley DC (2000) Structure of a covalently stabilized complex of a human alphabeta T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1. *The EMBO journal* 19: 5611–5624.
53. Hewitt CRA, Lamb JR, Hayball J, Hill M, Owen MJ, et al. (1992) Major histocompatibility complex independent clonal T cell anergy by direct interaction of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B with the T cell antigen receptor. *Journal of Experimental Medicine* 175: 1493–1499.
54. Sullivan DO, Arrhenius TOM, Sidney J, Guercio MDEL, Albertson M, et al. (1991) On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. *Journal of Immunology* 147.
55. De Magistris MT, Alexander J, Coggeshall M, Altman a, Gaeta FC, et al. (1992) Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* 68: 625–634.
56. Thayer WP, Dao CT, Ignatowicz L, Jensen PE (2003) A novel single chain I-A(b) molecule can stimulate and stain antigen-specific T cells. *Mol Immunol* 39: 861–870.
57. Thibodeau J, Dohlsten M, Cloutier I, Lavoie PM, Björk P, et al. (1997) Molecular characterization and role in T cell activation of staphylococcal enterotoxin A binding to the HLA-DR $\alpha$  chain. *Journal of Immunology* 158: 3698–3704.
58. Labrecque N, Thibodeau J, Sekaly RP (1993) Interactions between staphylococcal superantigens and MHC class II molecules. *Seminars in Immunology* 5: 23–32.
59. Kozono H, White J, Clements J, Marrack P, Kappler JW (1994) Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides. *Nature* 369: 151–154.
60. Natarajan SK, Stern LJ, Sadegh-Nasseri S (1999) Sodium dodecyl sulfate stability of HLA-DR1 complexes correlates with burial of hydrophobic residues in pocket 1. *Journal of Immunology* 162: 3463–3470.
61. Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Le Gall S, Raposo G, et al. (2001) HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proceedings of the National*

62. Fu XT, Karr RW (1994) HLA-DR alpha chain residues located on the outer loops are involved in nonpolymorphic and polymorphic antibody-binding epitopes. *Human Immunology* 39: 253–260.
63. Jardetzky TS, Stern LJ, Brown JH, Gorga JC, Urban RG, et al. (1994) Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368: 711–718.
64. Amin J, Weiss DS (1993) GABAA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* 366: 565–569.
65. Kappler JW, Herman A, Clements J, Marrack P (1992) Mutations Defining Functional Regions of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B. *Journal of Experimental Medicine* 175: 387–396.
66. Li H, Llera a, Tsuchiya D, Leder L, Ysern X, et al. (1998) Three-dimensional structure of the complex between a T cell receptor beta chain and the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Immunity* 9: 807–816.
67. Wirth S, Vessaz A, Krummenacher C, Baribaud F, Acha-Orbea H, et al. (2002) Regions of mouse mammary tumor virus superantigen involved in interaction with the major histocompatibility complex class II I-A molecule. *J Virol* 76: 11172–11175.
68. Zhu Y, Rudensky AY, Corper AL, Teyton L, Wilson I a. (2003) Crystal Structure Of MHC Class II I-Ab in Complex with a Human CLIP Peptide: Prediction of an I-Ab Peptide-binding Motif. *Journal of Molecular Biology* 326: 1157–1174.
69. Carson RT, Vignali KM, Woodland DL, Vignali DAA (1997) T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity* 7: 387–399.
70. Wen R, Broussard DR, Surman S, Hogg TL, Blackman MA, et al. (1997) Carboxy-terminal residues of major histocompatibility complex class II-associated peptides control the presentation of the bacterial superantigen toxic shock syndrome toxin-1 to T cells. *European Journal of Immunology* 27: 772–781.
71. Suri A, Lovitch SB, Unanue ER (2006) The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Current opinion in immunology* 18: 70–77.
72. Miyazaki T, Wolf P, Tourne S, Waltzinger C, Dierich A, et al. (1996) Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84: 531–541.
73. Painter C a, Negroni MP, Kellersberger K a, Zavala-Ruiz Z, Evans JE, et al. (2011) Conformational lability in the class II MHC 310 helix and adjacent extended strand dictate HLA-DM susceptibility and peptide exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 19329–19334.
74. Chervonsky AV, Medzhitov RM, Denzin LK, Barlow a K, Rudensky AY, et al. (1998) Subtle conformational changes induced in major histocompatibility complex class II molecules by binding peptides. *ProcNatlAcadSciUSA* 95: 10094–10099.
75. Wong P, Rudensky AY (1996) Phenotype and function of CD4 + T cells in mice lacking invariant chain. *Journal of Immunology* 156: 2133–2142.
76. Tobita T, Oda M, Morii H, Kuroda M, Yoshino A, et al. (2003) A role for the P1 anchor residue in the thermal stability of MHC class II molecule I-Ab. *Immunology letters* 85: 47–52.
77. Saline M, Rödström KEJ, Fischer G, Orekhov VY, Karlsson BG, et al. (2010) The structure of superantigen complexed with TCR and MHC reveals novel insights into superantigenic T cell activation. *Nature communications* 1: 119.
78. Wang L, Zhao Y, Li Z, Guo Y, Jones LL, et al. (2007) Crystal structure of a complete ternary complex of TCR, superantigen and peptide-MHC. *Nat Struct Mol Biol* 14: 169–171.
79. Blackman MA, Gerhard-Burgert H, Woodland DL, Palmer E, Kappler JW, et al. (1990) A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mls-1a. *Nature* 345: 540–542.
80. Woodland DL, Smith HP, Surman S, Le P, Wen R, et al. (1993) Major histocompatibility complex-specific recognition of Mls-1 is mediated by multiple elements of the T cell receptor. *Journal of Experimental Medicine* 177: 433–442.
81. Pircher H, Mak TW, Lang R, Balhausen W, Ruedi E, et al. (1989) T cell tolerance to Mlsa encoded antigens in T cell receptor Vbeta8.1 chain transgenic mice. *EMBO Journal* 8: 719–727.

liv

82. Yui K, Komori S, Katsumata M, Siegel RM, Greene MI (1990) Self-reactive T cells can escape clonal deletion in T-cell receptor Vbeta 8.1 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 7135–7139.
83. Vacchio MS, Kanagawa O, Tomonari K, Hodes RJ (1992) Influence of T cell receptor Valpha expression on Mlsa superantigen- specific T cell responses. *Journal of Experimental Medicine* 175: 1405–1408.
84. Smith HP, Le P, Woodland DL, Blackman MA (1992) T cell receptor alpha-chain influences reactivity to Mls-1 in Vbeta8.1 transgenic mice. *Journal of Immunology* 149.
85. Aude-Garcia C, Attinger a, Housset D, MacDonald HR, Acha-Orbea H, et al. (2000) Pairing of Vbeta6 with certain Valpha2 family members prevents T cell deletion by Mtv-7 superantigen. *Molecular immunology* 37: 1005–1012.
86. Herman A, Croteau G, Sekaly RP, Kappler J, Marrack P (1990) HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells. *Journal of Experimental Medicine* 172: 709–717.
87. Kang J, Chambers CA, Pawling J, Scott C (1994) Conserved amino acid residues in the CDR1 of the TCR b-chain are involved in the recognition of conventional Ag and Mls-1 superantigen. *Journal of Immunology* 152: 5305–5317.
88. Marrack P, Winslow GM, Choi Y, Scherer M, Pullen A, et al. (1993) The bacterial and mouse mammary tumor virus superantigens; two different families of proteins with the same functions. *Immunological Reviews* 131: 79–92.
89. Nguyen P, Woodland DL, Blackman MA (1996) MHC bias of Mls-1 recognition is not influenced by thymic positive selection. *Cellular Immunology* 167: 224–229.
90. Andersen PS, Lavoie PM, Sékaly RP, Churchill H, Kranz DM, et al. (1999) Role of the T cell receptor alpha chain in stabilizing TCR-superantigen-MHC class II complexes. *Immunity* 10: 473–483.
91. Ciurli C, Posnett DN, Sekaly RP, Denis F (1998) Highly biased CDR3 usage in restricted sets of beta chain variable regions during viral superantigen 9 response. *Journal of Experimental Medicine* 187: 253–258.
92. Candéias S, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D, Candéias S, et al. (1991) The V beta 17+ T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4+ versus CD8+ cells. *Journal of Experimental Medicine* 174: 989–1000.
93. Chies JA, Marodon G, Joret AM, Regnault A, Lembezat MP, et al. (1995) Persistence of V $\alpha$  6 + T cells in Mls-1 a mice. A role for the third complementarity-determining region (CDR3) of the T cell receptor beta chain in superantigen recognition. *Journal of Immunology* 155: 4171–4178.
94. Kilgannon P, Novak Z, Fotedar A, Singh B (2010) Junctional diversity prevents negative selection of an antigen-specific T cell repertoire. *Molecular immunology* 47: 1154–1160.
95. Stadinski BD, Trenh P, Smith RL, Bautista B, Huseby PG, et al. (2011) A role for differential variable gene pairing in creating T cell receptors specific for unique major histocompatibility ligands. *Immunity* 35: 694–704.
96. Deng L, Langley RJ, Wang Q, Topalian SL, Mariuzza RA (2012) Structural insights into the editing of germ-line-encoded interactions between T-cell receptor and MHC class II by V $\alpha$  CDR3. *Proc Natl Acad Sci USA* 190: 14960–14965.
97. Mehindate K, Thibodeau J, Dohlsten M, Kalland T, Sekaly RP, et al. (1995) Cross-linking of major histocompatibility complex class II molecules by staphylococcal enterotoxin A superantigen is a requirement for inflammatory cytokine gene expression. *Journal of Experimental Medicine* 182: 1573–1577.
98. Petersson K, Thunnissen M, Forsberg G, Walse B (2002) Crystal structure of a SEA variant in complex with MHC class II reveals the ability of SEA to crosslink MHC molecules. *Structure* 10: 1619–1626.
99. Krakauer T, Qun B, Young HA (2001) The Flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. *FEBS Letters* 500: 52–55.

100. Wang F, Xu Z, Ren L, Tsang SY, Xue H (2008) GABA A receptor subtype selectivity underlying selective anxiolytic effect of baicalin. *Neuropharmacology* 55: 1231–1237.
101. Nur-ur Rahman AKM, Bonsor DA, Herfst CA, Pollard F, Peirce M, et al. (2011) The T cell receptor beta-chain second complementarity determining region loop (CDR2beta governs T cell activation and Vbeta specificity by bacterial superantigens. *The Journal of biological chemistry* 286: 4871–4881.
102. Woodland DL, Wen R, Blackman MA (1997) Why do superantigens care about peptides? *Immunology Today* 18: 18–22.
103. Proft T, Fraser J (1998) Superantigens: Just like peptides only different. *Journal of Experimental Medicine* 187: 819–821.
104. Faubert A, Samaan A, Thibodeau J (2002) Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *JBiolChem* 277: 2750–2755.
105. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51–59.
106. Winslow GM, Scherer MT, Kappler JW, Marrack P (1992) Detection and biochemical characterization of the mouse mammary tumor virus 7 superantigen (Mls-1a). *Cell* 71: 719.
107. Wraight CJ, Van Endert P, Moller P, Lipp J, Ling NR, et al. (1990) Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *JBiolChem* 265: 5787–5792.
108. Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcomb C, Cresswell P (1994) Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1: 595–606.
109. Mahana W, Al-Daccak R, Leveille C, Valet JP, Hebert J, et al. (1995) A natural mutation of the amino acid residue at position 60 destroys staphylococcal enterotoxin A murine T-cell mitogenicity. *Infection & Immunity* 63: 2826–2832.
110. Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456–467.
111. Blackman MA, Woodland DL (1996) Role of the T cell receptor alpha-chain in superantigen recognition. *Immunological Research* 15: 98–113.
112. Crooks GE, Hon G, Chandonia J, Brenner SE (2004) WebLogo : A Sequence Logo Generator: 1188–1190.